TRANSFORMIERBARKEIT DER BLUTLYMPHOZYTEN VON PATIENTEN MIT CHRONISCH LYMPHATISCHER LEUKÄMIE UND MORBUS HODGKIN UNTER EINWIRKUNG VON PHYTOHÄMAGGLUTININ IN DER DIFFUSIONSKAMMER ("IN VIVO")

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Helmut Spitaler

Saarbrücken

1974

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
(Innere Medizin I) der Universität des Saarlandes
Direktor: Professor Dr. med. P. G. Scheurlen

TRANSFORMIERBARKEIT DER BLUTLYMPHOZYTEN VON PATIENTEN MIT CHRONISCH LYMPHATISCHER LEUKÄMIE UND MORBUS HODGKIN UNTER EINWIRKUNG VON PHYTOHÄMAGGLUTININ IN DER DIFFUSIONSKAMMER (" IN VIVO")

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

1974

vorgelegt von

Helmut Spitaler
geboren am 24. 12. 1943 in Pfaffenhofen/Ilm

Dekan: Prof. Dr. med. G. A. Jutzler

Referenten: Prof. Dr. med. A. Pappas
Prof. Dr. med. K. H. Booz

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mündliche Promotionsprüfung : 22.10.1974

INHALTSÜBERSICHT

	Seite
I. EINLEITUNG	1
A. Formen der Immunreaktion	1
B. Steuerung der Immunreaktion	1
C. Störungen der zellulären Immunreaktion bei lympho- und retikuloproliverativen Erkrankungen	4
D. Lymphozytenstimulierung durch Antigene und Mitogene	6
II. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	8
III. MATHERIAL UND METHODE	9
A. Patientengut	9
1. Gesunde Kontrollpersonen	9
2. Chronisch lymphatische Leukämie	9
3. Lymphogranulomatose	10
4. Lymphosarkomatose	11
B. Die Diffusionskammer	12
1. Bestandteile	12
2. Herstellung	12
C. Lymphozytengewinnung	13
D. Versuchstiere	15

Seite

E. Implantation, Entnahme der Kapseln, Anfertigung und Auswertung der Präparate 15

IV. ERGEBNISSE 19

A. Gesunde Kontrollpersonen 19
B. Chronisch lymphatische Leukämie 21
C. Lymphogranulomatose 25
D. Lymphosarkomatose 28
E. Thymidin-Markierung 29

V. DISKUSSION 30

A. Methode 30

B. Ergebnisse 35

1. Gesunde Kontrollpersonen 35
2. Chronisch lymphatische Leukämie 37
3. Lymphogranulomatose 41
4. Lymphosarkomatose 44
5. Mitosen und Thymidin-Markierung 44

VI. ZUSAMMENFASSUNG 46

Seite

VII. ANHANG - KASUISTIK

A. Tabellarische Darstellung der klinischen Daten 49

1. Gesunde Kontrollpersonen 49
2. Chronisch lymphatische Leukämie 50
3. Lymphogranulomatose 56
4. Lymphosarkomatose 63

B. Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse 17

1. Erläuterung der Darstellungsweise 64
2. Tabellen 66

VIII. LITERATURVERZEICHNIS I - XIII

I. EINLEITUNG

In den Organismus eingedrungene Stoffe, hauptsächlich Proteine und Polysaccharide, die zu einer immunologischen Reaktion führen und spezifisch mit dem Produkt dieser Reaktion reagieren, werden Antigen oder Immunogen genannt. Ihre Wirkung, die unter anderem abhängig ist von der Molekülgröße (die kleinsten Polypeptidantigene besitzen ein Molekulargewicht von 4 000 und 5 000) der Konformation, der chemischen Natur und der Resorptions- und Abbaufähigkeit, beruht auf Konfigurationen an der Moleküloberfläche, die dem Organismus unbekannt sind und sich über Größenordnungen mehrerer Aminosäuren oder Monosaccharide erstrecken. Diese Bezirke eines Antigens werden Determinanten oder determinierende Bereiche genannt und für die spezifische Reaktion verantwortlich gemacht, die in zwei Formen stattfinden kann (Übersicht bei HUMPHREY und WHITE 1970, HUMPHREY und WHITE 1971, STEFFEN 1968).

A. Formen der Immunreaktion

Je nach Verlauf und Mechanismus spricht man von Reaktionen vom Soforttyp (immediate hypersensitivity, humorale Immunreaktion), die sich kurze Zeit nach Antigenkontakt zeigen und von Reaktionen vom Spättyp (delayed hypersensitivity, zelluläre Immunreaktion), deren Folgen sich Tage bis Wochen nach Antigenapplikation bemerkbar machen (STEFFEN 1968).

Diese sich allein nach dem zeitlichen Ablauf richtende Einteilung ist jedoch nicht voll zutreffend. Erinnert sei hier an die Serumkrankheit mit ihrem immunologischen Mechanismus vom Soforttyp, die trotzdem einige Tage bis zu ihrem Ausbruch benötigt (STEFFEN 1968). Vielmehr ist eine neue, vom Mechanismus abgeleitete Definition notwendig. So verstehen wir unter einer Reaktion vom Soforttyp eine Zustandsänderung des Organismus, die auf einen

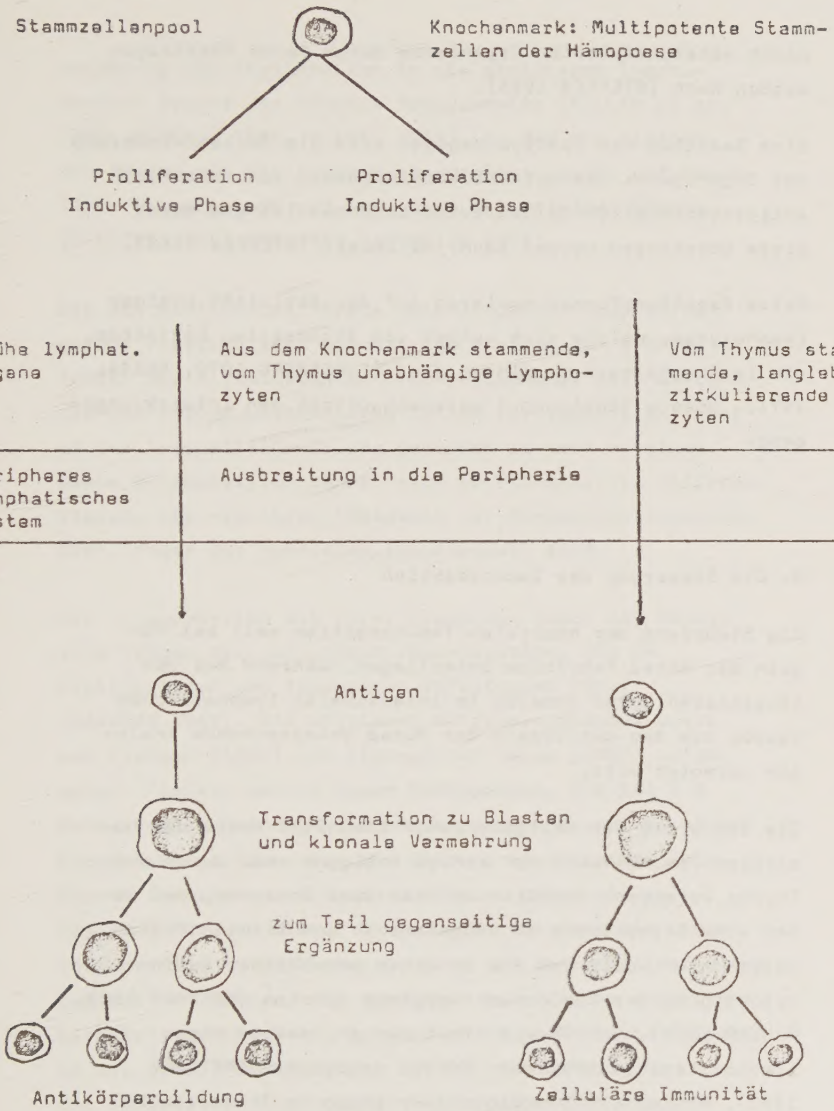


Abb. 1: Schema der Lymphozytenentwicklung aus: Nossal G. J. V., G. L. Ada, 1971

nicht sensibilisierten Organismus durch Serum übertragen werden kann (STEFFEN 1968).

Eine Reaktion vom Spättyp dagegen wird als Zustandsänderung des Organismus, die auf das Vorhandensein von spezifisch antideterminierten Zellen zurückzuführen ist und durch diese übertragen werden kann, definiert (STEFFEN 1968).

Beide Reaktionsformen basieren auf der Aktivität kleiner Lymphozyten, welche sich selbst von Stammzellen herleiten, die im Knochenmark zu finden sind (FUDENBERG 1970, NOSSAL 1971). Unsere Abbildung 1 veranschaulicht den Entwicklungsgang.

8. Die Steuerung der Immunreaktion

Die Steuerung der humoralen Immunreaktion soll bei Vögeln der Bursa Fabricius unterliegen, während bei den Säugetieren unter anderem im intestinalen lymphatischen Gewebe das den bei Vögeln der Bursa entsprechende Analogon vermutet wird.

Die Steuerung der zellgebundenen Immunität sowie der humoralen Immunantwort auf einige Antigene soll durch den Thymus erfolgen. Deutlich machten dies Versuche, bei denen eine Thymektomie an neugeborenen und älteren Tieren vorgenommen wurde und die zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Immunabwehrvorgänge führten (METCALF 1960, MILLER 1962). Vom Thymus nimmt man an, daß er einen lymphozytenstimulierenden Faktor produziert (METCALF 1960). Miller (1965) zeigte das, indem er Thymusgewebe in einer Millipore-Kammer thymektomierten Tieren implantierte und so die immunologischen Funktionen wieder herstellte. Doch wurde von anderen Autoren auch eine Aus-

wanderung von Thymuszellen in die peripheren lymphatischen Organe des Körpers festgestellt (MILLER et al. 1965, METCALF 1966, NOSSAL 1964), so daß der Einfluß des Thymus auf die Immunabwehrvorgänge sowohl auf zellulärem Weg wie auch auf humoralem Weg erfolgen könnte (STEFFEN 1968, HUMPHREY und WHITE 1971).

Die dem Einfluß des Thymus unterliegenden Lymphozyten werden T-Lymphozyten genannt und stellen den größten Anteil der zirkulierenden Lymphozytenmenge dar, während die vom Thymus unabhängigen Zellen (B-Lymphozyten) mehr an das lymphatische Gewebe gebunden zu sein scheinen. Diese B-Lymphozyten können sich zu Plasmazellen differenzieren, die mit ihrer Fähigkeit zur Immunglobulinproduktion Träger der humoralen Immunantwort sind.

Die T-Lymphozyten mit ihrer Steuerung durch den Thymus sind Träger der zellulären Immunreaktion, die zu histiozytären und lymphoiden Infiltraten führt (WAKSMAN 1962). Ein möglicher Aktivierungsmodus wurde von Fishman (1961) und Fishman und Adler (1963) aufgezeigt. Fishman konnte durch Makrophagen, die mit T 2 Bakteriophagen-Antigen inkubiert worden waren, in einer Lymphknotenzellenkultur die Bildung spezifischer Antikörper induzieren. Fishman und Adler gaben ein zellfreies Homogenat dieser Makrophagen zusammen mit Lymphknotenzellen in Diffusionskammern und implantierten diese bestrahlten Ratten, die daraufhin spezifische Antikörper bildeten. Arbeiten von Askonas et al. (1965) und Friedman et al. (1965) bestätigten, daß für die Weitergabe der Information zur Immunglobulinsynthese an die entsprechenden Zellgruppen ein Antigen-RNS-Komplex verantwortlich ist. Durch seine Einwirkung, welche durch den engen Kontakt zwischen Lymphozyten und Makrophagen begünstigt wird, vollzieht sich die Transformation zum sensibilisierten Lymphozyten. Der Weg führt über den

Immunoblasten, der damit zur Grundlage der zellulären, aber wie unsere Abbildung 1 zeigt, auch der humoralen Immunität ist.

Die T-Lymphozyten bilden durch ihre Vermehrung einen großen Stamm spezifisch sensibilisierter Zellen, die wegen ihrer großen Lebensdauer einen bedeutenden Beitrag zum immunologischen Gedächtnis leisten. Sie stimulieren bei Immunantworten auf gewisse Antigene die B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion. Sie geben lösliche Faktoren ab, die chemotaktisch für mononukleare Zellen sind, die Wanderung von Makrophagen verhindern und sie wahrscheinlich aktivieren, mitogen auf andere Lymphozyten wirken und die Gefäßpermeabilität erhöhen. Damit bilden sie einen Teil der Basis des Phänomens der spezifisch zellulären Immunreaktion (Übersicht bei Fudenberg 1970).

C. Störungen der zellulären Immunreaktion bei lympho- und retikuloproliverativen Erkrankungen.

Eine Verminderung der zellulären Abwehr und damit gesteigerte Anfälligkeit gegenüber Mykosen und Virusinfekten, aber auch gegenüber bakteriellen Infekten findet sich bei solchen Störungen der lymphopoetischen Organe, wie sie der Morbus Hodgkin und die chronisch lymphatische Leukämie als immunoproliverative Erkrankungen (DAMESHEK 1966) mit sich bringen. So werden die seltenen Mykosen Kryptokokkose, Histoplasmose und Aspergillose beim Morbus Hodgkin vermehrt gefunden (SCHEURLEN 1967). Auch werden Homotransplantate als Folge der Lymphozytenentartung bei der Lymphogranulomatose verzögert abgestoßen. Die Tuberkulinreaktion als Beispiel einer Reaktion vom Spättyp ist vermindert, wie Schier (1954) feststellte. Während 72 % seiner Kontrollpersonen positive Reaktionen auf Tuberkulin zeigten, waren es von seinen an Morbus Hodgkin erkrankten Patienten nur 21 %.

Parker und Mitarbeiter (1932) fanden vor der tuberkulostatischen Aera in 38,5 % ihrer Fälle von Lymphogranulomatose eine aktive Tuberkulose, während im allgemeinen Sektionsgut nur eine Tuberkulosehäufigkeit von 11 % gefunden wurde. Diese 1932 gemachte Feststellung konnte 1944 bestätigt werden, als man immer noch bei 20 % der Hodgkin-Patienten eine Tuberkulose vorfand.

Auch bei der chronisch lymphatischen Leukämie kommt es zu einer verzögerten Abstoßung von Homotransplantaten. (MILLER et al. 1961). Es traten gehäufte Infekte des Pharynx und der Atmungsorgane durch Bakterien und Pilze auf, mit einer Erkrankung an Herpes Zoster, der bei an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten häufig in schwerster Form und generalisiert abläuft, ist zu rechnen. Brody und Mitarbeiter (1966) weisen auf die verminderte Immunität gegenüber Bakterien und Viren hin. Des weiteren finden wir in der Regel einer Hyper- oder manchmal auch eine Hypogammaglobulinämie sowie zahlreiche Autoimmunerkrankungen wie Hämolytische Anämie, Idiopatische Thrombozytopenische Purpura und Rheumatoide Arthritis (DAMESHEK 1966).

Bei an Lymphogranulomatose und chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten ist die Fähigkeit zur Infektabwehr, die immunologische Kapazität, vermindert. Deren Grundlage ist der Immunoblast, der zum Teil nach Stimulation aus dem kleinen Lymphozyten entsteht (zum Teil auch aus undifferenzierten Retikulumzellen). Diese Stimulation der Lymphozyten kann, wie in vivo, auch in vitro durch spezifische Antigene durchgeführt werden (GROPP et al. 1966), ist der Organismus erst einmal sensibilisiert.

D. Lymphozytenstimulierung durch Antigene und Mitogene

Pearmain und Mitarbeiter (1962) wiesen als erste auf die Möglichkeit der Lymphozytenstimulierung durch Tuberkulin bei tuberkulinpositiven Patienten hin. Als weitere Antigene wurden von Elves und Mitarbeitern (1963 a) Diphtherie-Toxoid, von anderen Autoren (HIRSCHHORN et al. 1964 b, GRASBECK et al. 1963) Streptolysin-S und Leukozyten-Antiserum angewandt.

Durch die Anwendung des Phytohämagglutinins (PHA) wurde die Möglichkeit, Einzelheiten der Immunreaktion lymphatischer Zellen und deren Beeinflußbarkeit in der Kultur zu studieren, erheblich erweitert.

Phytohämgagglutinin wurde zum ersten Mal im Jahre 1916 angewandt, um rote Blutzellen zu agglutinieren (DORSET et al. 1916), wenig später, um so rote von weißen Blutzellen zu trennen, Osgood und Mitarbeiter (1955) benutzten Phytohämagglutinin, um Leukozyten aus dem peripheren Blut zu gewinnen und zu kultivieren. Bei solchen Versuchen entdeckte Nowell blastenartige Zellen in diesen Kulturen und führte 1960 (NOWELL 1960) das Entstehen dieser Zellformen auf die Einwirkung des Phytohämagglutinin zurück. Dukor und Dietrich (1967) stellten 1967 fest, daß Phytohämagglutinin die thymusabhängigen Lymphozyten stimuliert und die Transformationsrate bei thymektomierten Mäusen vermindert ist. Die Wirkungsweise des Phytohämagglutinins, eines Extraktes aus Phaseolus vulgaris (grüne Gartenbohne), das aus einer Protein- und Polysaccharid-Fraktion besteht, ist noch nicht eindeutig geklärt. Während man sich das Zustandekommen der agglutinierenden Eigenschaften durch Verbindung des Mucoprotein-PHA-Moleküls mit einem Polysaccharid-Molekül der Erythrozytenoberfläche erklärt (NOWELL 1960), besteht über die leukozytenstimulierenden Mechanismen die Ansicht, daß diese Substanz unmittelbar

am Zellkern der Lymphozyten angreift (MICHALOWSKI 1964). Neuere Untersuchungen nehmen als ersten Schritt der mitogenen Aktivität eine Bindung des Phytohämagglutinins an Receptoren der Zelloberfläche an (KORNFELD 1969), während die agglutinierende Eigenschaft auf der Bindung des Phytohämagglutinins an Glycoproteinstrukturen der Zelloberfläche beruhen soll (KORNFELD et al. 1969).

Coulson geht davon aus, daß die Antikörperproduktion in mehrere Schritte einzuteilen ist (COULSON et al. 1964). Danach identifiziert im ersten der Lymphozyt das ihm angebotene Antigen, im zweiten kommt es zur Produktion einer Übermittlersubstanz, die zelluläre Veränderungen in Gang bringt. Diese enden in der Transformierung und Zellteilung. Im dritten Schritt findet die Antikörperproduktion statt. Das PHA greift nach diesem Schema im Stadium der Produktion einer Übermittlersubstanz ein und übergeht so die Identifizierungsphase. Das könnte seinen so bezeichnenden und nur vom Staphylokokkenexotoxin (LING et al. 1964) und von Extrakten aus der Pflanze Phytolacca americana (POKEWEED, FARNER et al. 1964) erreichten Effekt auf Lymphozyten erklären. Diese werden in der Kultur durch das PHA über Zwischenstufen (transitional cells) zu großen Zellen mit locker strukturiertem Kern und einer bis mehreren Vakuolen umgeformt. Kennzeichnend ist des weiteren eine starke Basophilie des Cytoplasmas, das Ausfransungen als Zeichen einer lebhaften Motilität der Zellmembran aufweisen kann.

II. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

PHA wurde in der Regel bei in vitro-Lymphozytenkulturen angewandt. Bei längerer Kulturdauer, die allein dem dynamischen Prozeß der Lymphozytentransformation, besonders bei lympho- und retikuloproliverativen Erkrankungen gerecht werden kann (DAMESHEK), (Langzeit in vitro-Kulturen (HAVEMANN et al. 1968 b, PAPPAS et al. 1971) zeigten die verspätete Reaktion dieser Zellen auf PHA), zeigt sich aber bei dieser Methode die Schwierigkeit, den zu kultivierenden Zellen ein physiologisches Maß an Nährstoffen zu bieten. Mit ihr besteht keine Möglichkeit, ohne umständliche und den Infektionsprozeß fördernde Maßnahmen, den ph-Wert in physiologischen Bereichen zu halten, der, wenn er nicht eingehalten wird, zum Untergang von 30 % mehr Zellen führt, als normalerweise zu Grunde gehen (WILSON et al. 1968).

Wir glauben, mit der von uns angewendeten Methode, die sich auf den Regelmechanismus eines Tieres stützt, die erwähnten Mängel auszuschalten. Unser Ziel ist es, in den stimulierten Lymphozytenkulturen von an Lymphogranulomatose und chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten die Zahl der blastenartigen Zellen über eine Zeitspanne von elf Tagen zu prüfen, um so Hinweise auf die immunologische Kapazität dieser Patientengruppe zu erhalten. Die Transformationsraten sollen mit den klinischen Daten verglichen werden. Zusätzlich wurde die H^3-Thymidin Inkorporation der stimulierten Zellen berücksichtigt.

III. MATERIAL UND METHODE

A. Patientengut

Es wurden insgesamt 22 Versuche unternommen. Das dazu benötigte Blut stammt zum einen Teil aus der medizinischen Klinik der Universität Köln, zu einem zweiten Teil aus der medizinischen Poliklinik der Universität Köln, für die Kontrollversuche aber zum größten Teil aus der Blutspendezentrale der Kölner Universitätskliniken. Für unsere Versuche verwendeten wir Blut von acht gesunden Personen, von sechs an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten und von sieben an Lymphogranulomatose erkrankten. Ein Fall von Lymphosarkomatose wurde von uns untersucht.

1. Gesunde Kontrollpersonen

Fünf dieser acht Versuchspersonen waren männlich (Versuchsnummer 1, 2, 4, 5, und 8), drei weiblich (Versuchsnummer 3, 6, und 7). Weitere Angaben sind über diese Personengruppe nicht bekannt.

2. Chronisch lymphatische Leukämie.

Das Alter der Patienten, die zwischen einem Monat und 15 Jahren an chronisch lymphatischer Leukämie, gerechnet vom Tag der Diagnosestellung, erkrankt waren, lag zwischen 47 und 68 Jahren. Das Allgemeinbefinden der vier männlichen (Versuchsnummer 9, 11, 12 und 13) und zwei weiblichen (Versuchsnummer 10 und 14) Personen war, bis auf zwei Ausnahmen, die keine Beschwerden hatten (Versuchsnummer 12 und 13), mäßig.

Nach der Stadieneinteilung von Dameshek (DAMESHEK 1967), die sich hauptsächlich nach dem Befinden der Patienten, der Infektionsanfälligkeit sowie dem lymphoiden Befall des Gewebes, besonders von Milz und Lymphknoten, richtet, gehörte ein Patient mit einer Erkrankungsdauer von vier Jahren, der sonst beschwerdefrei war und weder Milztumor noch Lymphome aufwies, in die Gruppe I (Versuchsnummer 13). Die anderen Patienten waren bei mehr oder weniger starkem Befall von Milz (Versuchsnummer 9, 10, 11 und 12) und Lymphknoten (10, 11, 12 und 14) oder einem von diesem zu den Stadiengruppen II (Versuchsnummer 12 und 14) und III (Versuchsnummer 9, 10 und 11) zu rechnen.

Die Leukozytenwerte des peripheren Blutes lagen in zwei Fällen unter 10 000 (Versuchsnummern 9 und 10), in einem unter 20 000 (Versuchsnummer 11), in einem weiteren Fall bei 81 000 (Versuchsnummer 12) und in zwei Fällen zwischen 100 000 und 200 000 (Versuchsnummern 13 und 14) die Globulinwerte reichten von 3 rel. % (Versuchsnummer 10) bis 12 rel. % (Versuchsnummer 9 und 13). Zwei der Versuchspersonen hatten keine Behandlung erhalten (Versuchsnummern 12 und 13).

3. Lymphogranulomatose

Das Alter unserer Lymphogranulomatose-Patienten lag zwischen 22 und 74 Jahren, wobei das Mittel 36 Jahre betrug. Die Erkrankungsdauer dieser sieben Personen, drei davon weiblich (Versuchsnummern 15, 16 und 19), war naturgemäß weniger weit gestreut. Sie reichte von fünf Monaten (Versuchsnummer 20) bis drei Jahre (Versuchsnummer 15 und 16) wobei der eine Patient sich wohl fühlte (Versuchsnummer 16), während der andere (Versuchsnummer 15) wenige Tage nach unserem Versuch an den Folgen eines Lungenödems verstarb. Vier unserer Patienten befanden sich im Stadium IV der Erkrankung (Versuchsnummer 16,

15, 18 und 21), ein Patient im Stadium III (Versuchsnummer 20) und zwei im Stadium II (Versuchsnummer 17 und 19), Einteilungen, die den Krankenblättern entnommen wurden oder auf Grund der Lymphknotenlokalisation unter Beachtung des gebräuchlichen Schemas selbst vorgenommen wurden. Der Allgemeinzustand war gut bei fünf Patienten (Versuchsnummern 16, 17, 18, 19 und 20) und schlecht bei zwei Patienten (Versuchsnummern 15 und 21). Die BSG erreicht nur in einem Fall Normalwerte (Versuchsnummer 17), in allen anderen Fällen war sie stark erhöht.

Die Leukozytenwerte lagen in keinem Falle über 10 000 Zellen, während sie in einem Fall nur 2 000 Zellen pro mm^3 betrugen (Versuchsnummer 21). Die Gamma-Globulinwerte schwankten zwischen 9,0 rel.% bei einer Patientin, (Versuchsnummer 15) im Finalstadium der Erkrankung und 34 rel.% bei einem seit zwei Jahren erkrankten Patienten (Versuchsnummer 18), der sich, bei gutem Allgemeinzustand, im Stadium IV der Erkrankung befand. Dieser Patient wies auch mit 110/125 mm die höchste Blutsenkung aller unserer Versuchspersonen auf. Zum Zeitpunkt des Versuchs erhielt nur dieser Patient, der bis sechs Wochen vor unserem Versuch Diabolen-Compositum verordnet bekommen hatte, keine Behandlung. Alle anderen Versuchspersonen waren mit Zytostatika und zum Teil auch Bestrahlungen behandelt worden.

4. Lymphosarkomatose

Über die an Lymphosarkomatose erkrankten Personen können keine klinischen Angaben gemacht werden.

Eine tabellarische Darstellung der klinischen Daten unserer Versuchspersonen findet sich im Anhang.

B. Die Diffusionskammer

1. Bestandteile der Diffusionskammer

Zur Durchführung der in vivo-Kultivierung wurden Diffusionskammern der Firma Millipore (USA, Watertown 72, Man.) benutzt. Diese bestehen aus einem nicht toxischen Plexiglasring von 2 mm Höhe und 10 mm Innen- sowie 14 mm Außendurchmesser, der die Firmenbezeichnung II UVA trägt und aus zwei Filtern mit der Firmenbezeichnung VCW POI 300, die aus Celluloseestern hergestellt sind und eine Porengröße von 0,1 µm haben. Filter und Ring, der in seiner Seitenwand eine etwa 1 mm starke Bohrung für seine Füllung besitzt, werden mit MF Cement von geringer Toxität zusammengeklebt. Als Hilfsmittel dient eine ebenfalls von der Firma Millipore gelieferte Vorrichtung, die den absolut dichten Abschluß von Filtern und Plexiglasring gewährleistet, der nötig ist, um keine Zellen aus- oder eintreten zu lassen.

2. Herstellung der Diffusionskammern

Zur Herstellung der Diffusionskammern wird jeweils ein Plexiglasring in eine dem Ringdurchmesser entsprechende Aussparung der bereits erwähnten Vorrichtung gelegt und mittels eines Perlonfadens mit MF Cement dünn bestrichen. Ein Filterplättchen wird aufgelegt und mit einer Art Stempel, dessen Durchmesser dem eines Ringes entspricht, angepreßt. Hierbei ist darauf zu achten, daß das Filterplättchen den Ring möglichst gleichmäßig überlappt, um den so wichtigen sicheren Abschluß zu gewährleisten. Nach etwa einminütiger Trocknung wird der nun auf einer Seite mit einem Filter versehene Ring

vorsichtig mit einer Pinzette umgedreht und in gleicher Weise die andere Seite geklebt. Die Kapseln wurden in der Regel am Tage vor dem jeweiligen Versuch hergestellt, da zur Fertigung von 10 Diffusionskammern doch etwa eine Stunde benötigt wurde. Des weiteren produzierten wir meist einige Kapseln mehr, da die Gefahr bestand, durch ein Abrutschen der Pinzette, mit der die Diffusionskammer beim Füllen gehalten wurde, die Filtermembran zu beschädigen. Bis zu ihrer Verwendung wurden die Diffusionskammern möglichst keimfrei aufbewahrt.

Abb. 2:
Anfertigung der Diffusionskammern mit Kunststoffringen MF-Cement und Spezialwerkzeug (Millipore)

C. Lymphozytengewinnung

40 - 60 ml Venenblut wurden mit der entsprechenden Zahl Plastikspritzen, deren Wände mit einer Liqueminmenge von 1 % des Füllungsvolumens (1 000 I.E. Heparin) benetzt worden waren, aus der Kubitalvene entnommen. Das Blut wurde nach sofortiger steriler Abdeckung der Spritzenöffnung zwei Stunden bei 37°C zur Sedimentation stehen gelassen. Die aus dem Überstand erhaltene und mit

Leukozyten angereicherte Zellsuspensionen wurden bei aufrecht stehender Spritze und unter Verwendung einer umgebogenen Injektionsnadel vorsichtig in ein steriles Gefäß abgespritzt.
Aus ihr wurden die Granulozyten und Monozyten nach dem von Rabinowitz angegebenen Verfahren (RABINOWITZ 1964) herausgetrennt. Bei dieser Methode heften sich Granulozyten und Monozyten auf Grund ihrer verschiedenen Oberflächeneigenschaften in graduellen Abstufungen an Glaswollfasern (GROPP et al. 1966). Lymphozyten dagegen passieren die Glaswollschicht wegen ihrer geringen Adhaesionsfähigkeit ungehindert. Die Trennung mußte unter sterilen Bedingungen bei 37°C durchgeführt werden. Nachdem vor der Trennung Leukozytenzahlen und Lymphozytenwerte bestimmt worden waren, bestimmten wir diese Werte nach der Trennung noch einmal.
Die Suspension wurde nun auf eine Zellzahl von ungefähr 10 000 Lymphozyten/mm^3 eingestellt, wobei die Gesamtmenge der erhaltenen Suspension bei einem Fassungsvermögen von 0,157 ml pro Kapsel und bei in der Regel zehn Kapseln pro Versuch unter Hinzurechnung einer gewissen Verlustmenge von 2,0 ml nicht unterschreiten durfte. Bei dieser Zellzahl enthielt jede Kapsel etwa 1.570.000 Zellen. Die Einstellung geschah bei zu niedriger Zellzahl durch zehnminütiges Zentrifugieren der Suspension bei 900 U/Min. und anschließendem Abpipettieren des Überstandes um eine vorher errechnete Menge. Bei zu großer Zellzahl wurde autologes Plasma, das durch stärkeres Zentrifugieren und anschließendes Abpipettieren des Überstandes einer Zweitmenge gewonnen wurde, zugegeben.

Eine zu niedrige Zellzahl fanden wir häufig bei den an Lymphogranulomatose erkrankten Patienten. Hier konnte die geforderte Zellzahl von 10 000/mm^3 auch einige Male nicht erreicht werden, da die zur Verfügung stehende Serummenge auf der einen Seite keine weitere Konzentrierung mehr

gestattete, auf der anderen Seite die Rücksicht auf die Patienten, die zum Teil in einem sehr schlechten Allgemeinzustand waren, eine zu große Belästigung durch die Blutentnahme verbot.

Die für die Versuche bestimmte Menge wurde nun vorsichtig umgeschüttelt, um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Zellen zu erreichen. Es versteht sich, daß alle Manipulationen, die sich auf die für die Versuche bestimmte Suspension erstreckten, unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurden.

In die erhaltene Menge gaben wir o,4 % PHA und stellten dann alles bis zur weiteren Verwendung unter steriler Abdeckung bei 37^{o} C in den Brutschrank.

D. Versuchstiere

Die Diffusionskammern wurden Albino-Ratten (Wistar) von etwa 200 Gramm Gewicht implantiert. Die Tiere wurden mit ungefähr 1,5 ml Nembutal, das im Verhältnis 1 : 10 mit Aqua destillata verdünnt worden war und im Gebiet der Leistenbeuge intraperitoneal injiziert wurde, narkotisiert. Die Wirkung der Injektion begann nach etwa 15 Minuten, doch traten sowohl hier als auch bei der Wirkungsdauer von normalerweiser einer Stunde große Schwankungen auf, die zur Nachinjektion zwangen oder zu Überdosierungserscheinungen führten.

E. Implantation, Entnahme der Kapseln, Anfertigung und Auswertung der Präparate.

Den narkotisierten Tieren wurde in einem 2 x 2 cm großen Bauchgebiet die Behaarung entfernt. Sie wurden fixiert und dann ein etwa 1,5 cm langer paramedianer Schnitt angelegt, der die Bauchhöhle eröffnete. Die für das

Tier vorgesehenen Diffusionskammern, in der Regel zwei, werden durch die im seitlichen Rand des Ringes angebrachte Öffnung mit einer feinen Nadel und aufgesetzter Spritze gefüllt und die Öffnung durch einen Tropfen MF Cement, aufgetupft mit einem Perlonfaden, verschlossen.

Der Füllungsgrad der Kapseln ließ sich dabei leicht durch die Filtermembran beobachten. Zu berücksichtigen war, daß der Luftaustritt beim Füllen der Diffusionskammer hauptsächlich durch die von der Injektionsnadel benutzte Öffnung erfolgte, eine zu große Nadel führte zu deren Verschluß und damit durch Erhöhung des Innendrucks zum Zerreißen der Filtermembranen.

Die gefüllten Kapseln wurden in die Bauchhöhle implantiert und mit getrennten Nähten Muskulatur und Haut verschlossen. Das Einbringen der Kapsel erfolgte selbstverständlich unter möglichst keimfreien Bedingungen, die wir durch anschließendes Betupfen der Wunde mit Desinfektionsmittel unterstützten.

Nach Ablauf der Versuchsdauer von 3, 5, 7, 9 und 11 Tagen bzw. 72, 120, 168, 216 und 264 Stunden wurden die Tiere mit Äther getötet. Unmittelbar darauf wurde die Bauchhöhle geöffnet und die Kapseln, die sich oft im kleinen Becken, unter der Leber oder eingeschlagen in Netz und Darm fanden, entnommen.

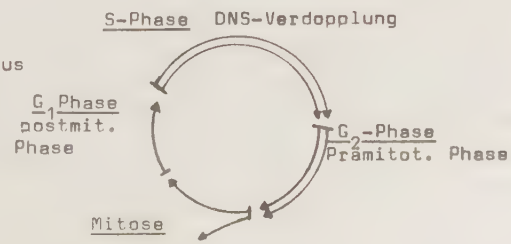
Die zu Beginn des Versuches mit MF Cement verschlossene Öffnung des Plexiglasringes wurde bei einer der Kapseln mit einer Injektionsnadel durchgestoßen, der Inhalt entnommen und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Bei 900/U min fand sich nach 10 Minuten ein deutlicher Bodensatz,

der, nach Entfernen des Überstandes, unter Belassen einer geringen Restmenge, umgeschüttelt, mit einer Pipette aufgesogen und auf einem Objektträger ausgestrichen wurde. Gleichzeitig wurden auch die Innenwände der vom Plexiglasring entfernten Filter über einen Objektträger gestrichen, um hier anhaftendes Zellmaterial ebenfalls zu erfassen.

Nach der Lufttrocknung wurden die erhaltenen Präparate in einem Gemisch von absolutem Alkohol und konzentrierter Essigsäure im Verhältnis 3 : 1 fixiert, anschließend wurden die Präparate nach May-Grünwald gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht, die andere Kapsel wurde zur autoradiographischen Auswertung vorbereitet und hierzu mit H^3-Thymidin markiert.
Thymidin gehört chemisch zur Gruppe der Nudeoside, die aus einer Base und einem Zucker bestehen. Im Falle des Thymidin ist die Base das Thymin, der Zucker eine Desoxyribose. Damit zählt Thymidin zur Gruppe der Desoxyribonucleinsäuren oder DNS, die im Zellkern vorkommen. Dieser ist zentraler Ort im Zellteilungsgeschehen, das in verschiedene Zeitabschnitte einzuteilen ist und in dem Desoxyribonucleinsäuren und ihre Verdopplung als Träger der genetischen Information die primäre Rolle spielen. Während dieser Zeit der DNS-Verdopplung oder auch S-Phase wird Thymidin und damit auch H^3-Thymidin in den Zellkern eingebaut. Die S-Phase folgt der G_1- oder postmitotischen Phase und geht in die G_2- oder prämitotische Phase über, der sich die Mitose anschließt.

Abb. 3

Zellteilungszyklus prolif. Zellen aus G. Schwarze, Inauguraldissert. Köln 1969



DNS-Synthese umd Mitose sind Abläufe, die normalerweise zeitlich koordiniert sind. Damit stehen die Zahl der Immunoblasten, als prämitotische Zellform, und die Zahl der H^3-Thymidin markierten Zellen als DNS-Synthese abhängig und damit ebenfalls prämitotischen Ursprungs, in einem bestimmten, sich entsprechenden Verhältnis. Die Zahl der H^3-Thymidin markierten Zellen kann daher zur Bestätigung der erhaltenden Immunoblastenwerte herangezogen werden.

Im Gegensatz zu Parrish et al.(1963),die H^3-Thymidin den Versuchstieren intraperitoneal einführten und so noch während der Kultivierung über den Organismus des Wirtstieres eine H^3-Markierung der Zellen erreichten, gaben wir die frisch aus der Peritonealhöhle entnommenen Diffusionskammern mit ihrem Zellinhalt in H^3-Thymidin, in dem wir sie bei 37° C für 60 Minuten beließen, einer Zeit, die von Cooper (1966) für die Markierung von Leukozytenkulturen gefordert wird. Nach Ablauf einer Stunde wurden die Kapseln aus dem H^3-Thymidin entfernt und ihr Inhalt nach der bereits dargestellten Methode auf einem Objektträger ausgestrichen und fixiert. Danach wurden diese mit K_2-Emulsion beschickt und 11 Tage bei 4° C in lichtdichter Verpackung der β-Strahlung des H^3-Thymidin exponiert. Schließlich wurden die Präparate fotografisch entwickelt, mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch ausgezählt.

Die Auswertung erfolgte durch Auszählen von 200 Zellen, wobei wegen der unterschiedlichen Dichte der Ausstriche und der Kummulationsneigung der Zellen die Ausstriche an verschiedenen Stellen beurteilt wurden, um möglichst unverfälschte Ergebnisse zu erhalten. Auch wurden in mehreren Fällen bereits ausgewertete Präparate noch einmal durchgemustert, wobei sich stets die bereits erhaltenen Werte bestätigten.

IV. ERGEBNISSE

In unseren Ergebnissen sind Immunoblasten, Transitional Cells, Mitosen, Makrophagen und Lymphozyten berücksichtigt, wobei die Blasten die folgenden Kriterien zu erfüllen hatten. Sie mußten einen locker struktuierten Kern und eine bis mehrere große Vakuolen besitzen, ihr Cytoplasma hatte eine starke Basophilie und Ausfransungen als Zeichen einer lebhaften Motilität aufzuweisen. Wurden diese Kriterien nicht ganz erfüllt, zählten wir solche Zellen zur Gruppe der transitional cells, zu Übergangsformen, bei denen nicht zu entscheiden war, ob sie sich zu Immunoblasten oder Makrophagen entwickeln würden.

Besaß eine Zelle einen randständig gelegenen, halbmondförmigen oder ovalen Kern und fanden sich in einem leicht basophilen Cytoplasma kleinere Vakuolen und feine cytoplasmatische Granula, wurden sie als Makrophagen bezeichnet. Doch besaßen solche Zellen eine ausgesprochene Vielgestaltigkeit, die ihre Einordnung manchmal erschwerte.

A. Gesunde Kontrollpersonen

Die Lymphozytenkulturen nach der von uns gewählten Methode führen nach drei Tagen, entsprechend 72 Stunden, zu Transformationsraten, die zwischen 68 % und 90 % liegen, bei einem Mittelwert von 80,4%. Bei länger andauernder Kultivierung steigen unsere Werte nicht mehr an. Es kommt vielmehr zu einem Abfall der Transformationsrate in der Fünf-Tage-Kultur (120 Stunden) auf Werte, die zwischen 50 und 81 % liegen und hiermit zu einem Mittelwert von 72,6 % führen. Der durchschnittliche Abfall beträgt somit 7,8 %. Nach siebentägiger Kulturdauer (168 Stunden) liegt die Transformationsrate in unseren Kontrollversuchen

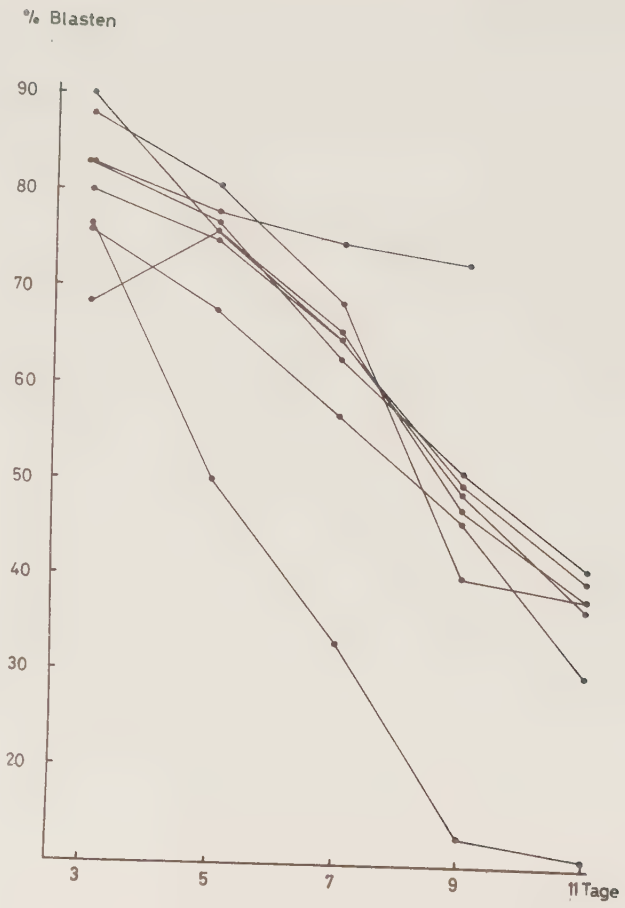
bei 30 - 75 % (Mittel 61,2 %), nach neun Kulturtagen (216 Stunden) bei 13 - 74 % (Mittel 46,1 %) und nach elftägiger Kultur (264 Stunden) bei 11 - 40 % (Mittel 33,5 %). Der prozentuale Abfall zwischen den Ergebnissen des fünften und siebten Kulturtages hat eine Größe von 11,4 %. Er steigt geringfügig auf 15,1 %, um die die Werte des siebten und neunten Tages differieren und bleibt dann bei 12,5 % für die Ergebnisse des neunten und elften Tages.

Die Zahl der Übergangsformen erreicht ihr Maximum in der Fünf-Tage-Kultur. Während sie nach drei Tagen 8,12 % beträgt, finden sich nach fünf Tagen 11,87 % und nach sieben Tagen immer noch 9,5 % dieser Zellen.

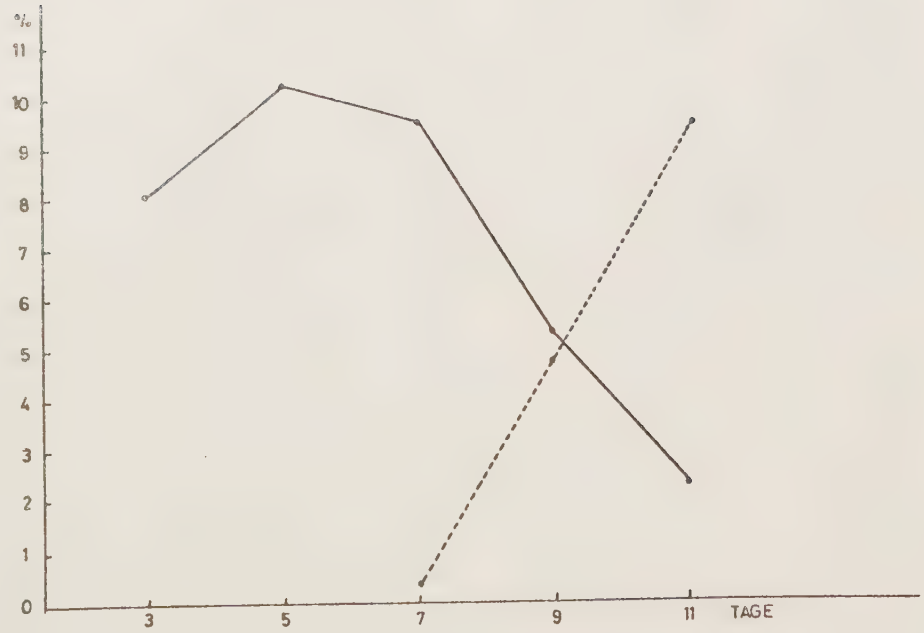
Makrophagen wurden in unseren Kulturen von Lymphozyten gesunder Personen nur in drei Fällen (Versuchsnummer 5, 7 und 8) vor dem neunten Tag gesehen, sie nehmen aber von da ab in allen Kulturen zu und erreichen ihre Maximalwerte, bis auf eine Ausnahme (Versuchsnummer 8), am elften Kulturtag, wo ihre Zahl in zwei Fällen (Versuchsnummer 4 und 6) sogar 15 % erreicht.

Interessant ist der fast dem Abfall der transitional cells entsprechende Anstieg dieser Zellform, der in einem Diagramm veranschaulicht ist.

Der Gipfel in der Zahl der Mitosen findet sich in der Drei-Tage-Kultur mit 1,5 %. Nach fünf Tagen fällt der Mitose-Index auf 0,75 % ab. Nach sieben Kulturtagen liegt er bei 0,37 %, von denen er dann im weiteren Verlauf der Versuche auf Null absinkt.



Gesunde
Kontrollpersonen



Verhalten von
Makrophagen und
Transitional cells

Makrophagen ----------

Transitional
cells ——————

8. Chronisch lymphatische Leukämie

Die Transformationsraten der Lymphozyten unserer an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten sind wesentlich geringer und differieren in ihrer Höhe wesentlich mehr als die der Lymphozyten unserer Kontrollpersonen. Sie betragen nach drei Kulturtagen 3,5 - 43 %, bei einem Durchschnittswert von 14,1 %. Nach fünf Tagen steigt das Mittel der Transformationsraten auf 19,5 % an, wobei die Einzelwerte von 1 % - 37 % reichen. Auch nach sieben Kulturtagen fällt dieser Mittelwert nicht wesentlich ab, er beträgt hier immer noch 17,8 %, wobei die Einzelwerte Größenordnungen von 0 - 46,0 % haben. Erst nach neun Tagen findet sich ein Abfall der durchschnittlichen Transformationsrate von 8,7 %. Unsere Einzelwerte reichen dabei von 0 - 21 %. Nach einer Kulturdauer von elf Tagen konnten wir in unseren Zellaustrichen keine Immunoblasten mehr entdecken.

Die höchste Transformationsrate mit einer Blastenzahl von 32 % nach einer Kulturdauer von drei Tagen finden wir bei einer Patientin (Versuchsnummer 1o), die seit sieben Jahren erkrankt ist und eine absolute Blutlymphozytenzahl von 1 505 besitzt, die niedrigste dieser Versuchsgruppe.

Neben den submandibularen, nuchalen, axillaren und retroperitonealen Lymphknoten ist die Milz um 8 - 9 Querfinger vergrößert. Behandelt wurde die Patientin bis 6 Wochen vor unserem Versuch mit Leukeran, Prednison und Röntgentiefenbestrahlung der Milz, danach mit weiteren Milzbestrahlung, Urbason, Gammavenin und Antibiotika. Nach fünf Tagen steigt der für diese Gruppe recht hohe initiale Immunoblastenwert um ein weiteres Prozent auf 33 % an, erreicht nach sieben Tagen mit 38 % sein Maximum, um dann nach 9 Tagen auf 21 % abzufallen.

Die mit 19 % zweithöchste Transformationsrate in der Drei-Tage-Kultur weist ein 53 Jahre alter Patient auf, bei dem die Diagnose chronisch lymphatische Leukämie vor neun Jahren gestellt wurde. Seine nuchalen, axillaren und inguinalen Lymphknotenvergrößerungen sowie eine Verklumpung beider Lungenhili wurde in dieser Zeit unter anderem mit Ultracorten und in den letzten sechs Wochen vor unserem Versuch mit zusätzlichen Reverin- und Terramycingaben behandelt. Dieser Patient, der die Versuchsnummer 11 trägt, befand sich in mäßigem Allgemeinzustand, sein Blutlymphozytenwert betrug 12 922 Zellen/mm^3. In der Fünf-Tage-Kultur stieg die Transformationsrate seiner Lymphozyten weiter auf 37 % an, fiel jedoch auf 8 % am siebten Kulturtag und auf 7 % im weiterem Verlauf des Versuches ab.

Einen ähnlichen, wenn auch niedrigeren Verlauf hatten die Transformationswerte der Kultur Nummer 14. Von 9 % nach drei Kulturtagen stiegen sie auf 23 % nach fünf Tagen, fielen danach allerdings auf 0 % nach sieben Tagen und im weiteren Verlauf des Versuches ab. Die Lymphozyten dieser Kultur stammen von einem Patienten mit einer Blutlymphozytenzahl von 184 992 Zellen/mm^3, der seit drei Jahren erkrankt ist und nun iliacale, axillare und inguinale, nuchale, supraklavikulare sowie prae- und paratracheale Lymphknotenvergrößerungen aufweist. Behandelt wurde er mit Myleran, Megacillin, Leukeran und Steroiden.

Zu den drei Kulturen unserer Versuche, die ihre maximalen Transformationsraten am siebten Kulturtag erreichen, gehört neben der bereits besprochenen Kultur Nummer 10 die Kultur Nummer 12. Deren Lymphozyten stammen von einem seit einem Monat erkrankten Patienten mit einem Blutlymphozytenwert von 72 090 Zellen/mm^3, der 48 Jahre alt ist. Neben axillaren und inguinalen, nuchalen und paraaortalen Lymphknoten war die Milz um drei Zentimeter vergrößert.

Die Lymphozyten dieser Kultur waren nach drei Tagen in 8,5 % zu Blasten transformiert. Nach fünf Kulturtagen waren bereits 14 % der vorhandenen Zellen Immunoblasten, nach sieben Tagen wuchs die Zahl auf 46,0 % und sank dann auf 18,5 % am neunten Tag ab. Nach elf Kulturtagen konnten wir in den Ausstrichen keine Zellen mehr entdecken. Ebenfalls am siebten Tag erreichte die Kultur Nummer 13 ihre maximale Transformationsrate. Wie auch der Patient Nummer 12 wurde dieser seit 4 Jahren erkrankte Patient nicht behandelt. Vergrößerte Lymphknoten oder ein Milztumor konnten bei ihm nicht nachgewiesen werden. Bei einer Blutlymphozytenzahl von 42 400 waren nach drei Tagen 3,5 % Immunoblasten in den Ausstrichen zu finden. Nachdem dieser Wert auf 1 % für die Fünf-Tage-Kultur abgesunken war, stieg er nach sieben Tagen auf 10 %. Nach neun und elf Tagen fanden wir keine Immunoblasten mehr.

Eine zwar anfangs für diese Versuchsgruppe verhältnismäßig hohe, dann aber später beständig abfallende Transformationsrate stellten wir beim Versuch Nummer 9 fest. Hier sind nach drei Tagen 13 % der Zellen zu Immunoblasten transformiert. Nach neun Tagen beträgt dieser Wert nur noch 9 % und fällt dann ab auf 5 % nach sieben Kulturtagen. Nach einem geringen Anstieg um 1 % nach neun Tagen sind nach elf Kulturtagen auf den Objektträgern nur noch untransformierte Zellen zu sehen. Die Lymphozyten dieser Kultur stammen von einem Patienten, bei dem die Diagnose chronisch lymphatische Leukämie vor 15 Jahren gestellt worden ist. Neben der längsten Erkrankgsdauer besitzt er mit einem Milztumor, der bis ins kleine Becken reicht, die am meisten vergrößerte Milz. Vergrößerte Lymphknoten konnten nicht festgestellt werden. Behandelt wurde dieser Patient mit Leukaran und Gammavenin.

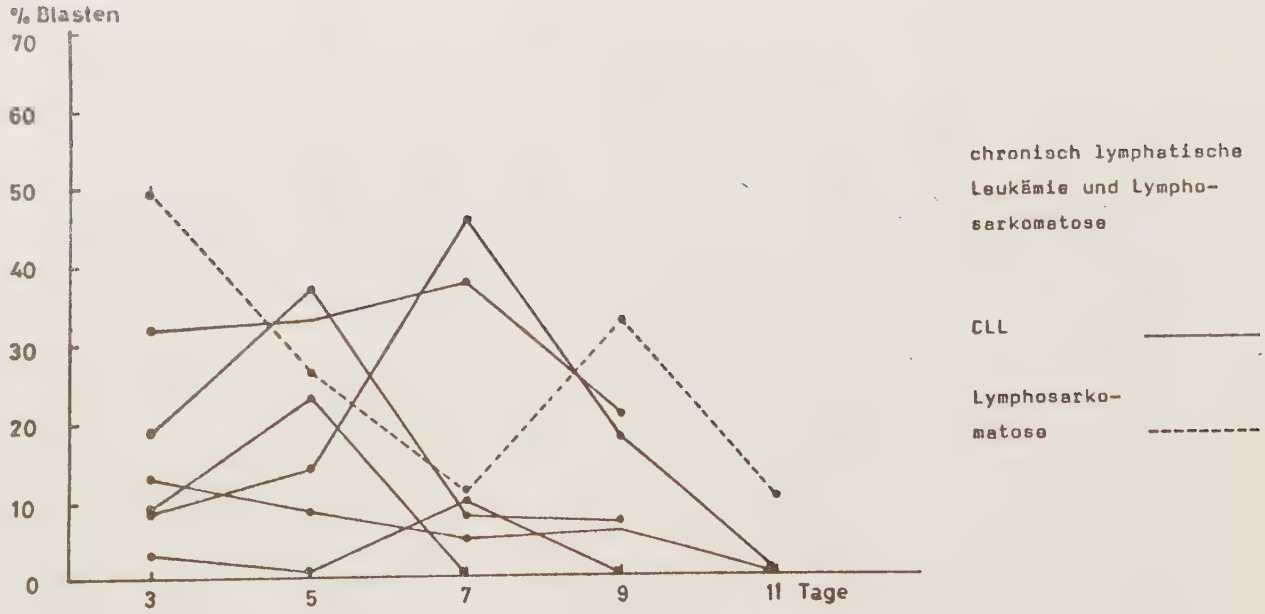
Die Zahl der transitional cells ist in den Lymphozytenkulturen unserer an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten geringer als in den Kulturen unserer Kontrollversuche. Nach drei Tagen treten im Mittel 1,0 % dieser Zellen auf, deren Zahl sich nach fünf Kulturtagen auf 3,7 % erhöht. Nach sieben Tagen erreichen die transitional cells mit einem Mittelwert von 8,9 % ihre maximale Transformationsrate, um dann über 8 % am neunten Kulturtag auf 0 % am Ende der Versuchsreihe abzufallen. Ähnliche Verhältnisse wie in den Kulturen der gesunden Kontrollpersonen, wo die Summe aus transitional cells und Makrophagen bei Abnahme der ersten und Zunahme der zweiten annähernd gleich blieb, finden sich in den Lymphozytenkulturen der an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten nicht. Hier sind die im Versuch Nummer 14 auftretenden Makrophagen wohl als Einzelerscheinung zu werten, da in allen anderen Kulturen keine derartigen Zellen zu entdecken waren.

Auch die Zahl der Mitosen in den Lymphozytenkulturen dieser Patientengruppe ist wesentlich geringer als in den Kontrollversuchen. Nach drei Tagen beträgt der Mitose-Index nur 0,66 %, nach 5 Tagen nur noch 0,33 %, an allen weiteren Kulturtagen 0 %. Beziehungen zwischen ihm und den klinischen Daten waren nicht zu finden.

C. Lymphogranulomatose

Die Ergebnisse der Lymphozytenkulturen der an Morbus Hodgkin erkrankten Patienten sind wesentlich uneinheitlicher als die unserer Kontrollversuche. Bei einem Mittelwert von 36,9 % nach einer Kulturdauer von drei Tagen reichen die Einzelwerte von 3 % bis 78 %. Nach fünf Tagen hat sich der Mittelwert geringfügig auf 38,3 % erhöht, und auch die Einzelwerte sind mit Ergebnissen, die zwischen 5 % und 75 % liegen, nur um 2 % bzw. 3 % verändert. Erst nach sieben Kulturtagen tritt ein Abfall der durchschnittlichen Transformationsrate auf 30 % ein bei Werten, die von 5 % bis 73 % reichen. Nach einer Kulturzeit von 9 Tagen haben wir im Durchschnitt immer noch 23,4 % Immunoblasten gefunden, wobei die größte Transformationsrate 70 %, die niedrigste 2 % betrug. Erst nach elf Kulturtagen waren in allen Präparaten, bis auf eine Ausnahme mit 10 %, keine Immunoblasten mehr aufzufinden.

Der Vergleich zwischen den klinischen Daten der Versuchspersonen und den Transformationsergebnissen ihrer Lymphozyten zeigt, daß die Patienten mit den Versuchsnummern 17 und 19, die nach den bereits dargelegten Gesichtspunkten den Stadiengruppen II zuzuordnen waren, sowohl die promptesten als auch die höchsten Transformationsraten aufzuweisen hatten. Hierbei lag der Patient Nummer 17 mit 78 % Immunoblasten nach drei Kulturtagen nicht nur im Normbereich unserer Kontrollversuche, sonder mit 70 % Immunoblasten am neunten Kulturtag auch fast 24 % über den mittleren Transformationsergebnissen der Lymphozyten gesunder Kontrollpersonen. Dieser Patient war seit 1.1/2 Jahren erkrankt, vergrößerte Lymphknoten wies er im Halsbereich, in der Inguinalgegend und paraaortal auf. Neben einer völlig normalen BSG von 5/13 mm betrug bei einem


% Blasten
70
60
50
40
30
20
10
0
3
5
7
9
11 Tage
chronisch lymphatische Leukämie und Lymphosarkomatose
CLL
Lymphosarkomatose

Gesamteiweißwert von 5,34 g% der γ-Globulingehalt 15,o %. Behandelt worden war er bis sechs Wochen vor Beginn des Versuches mit Natulan, innerhalb dieser Zeit zusätzlich mit Vincristin, Endoxan und γ-Globulinen.

Die Patientin Nummer 19, die mit 60 % Immunoblasten nach drei Tagen und 70 % Immunoblasten nach fünf Kulturtagen die zweitgrößte Transformationsrate aufzuweisen hatte, war mit einer Dauer von zwei Jahren nicht wesentlich länger erkrankt. Neben den Lymphknotenvergrößerungen im Halsbereich bestand der zusätzliche Verdacht auf ein Karzinom in der linken Brust. Mit einem Gesamteiweißwert von 6,15 g% und 14,0 % γ-Globulinen hatte sie eine BSG von 88/121 mm, behandelt worden war sie ebenfalls mit Cytostatika, zusätzlich noch mit Bestrahlung. Die Lymphozyten ihrer Kultur mit der nach drei und fünf Tagen recht hohen Transformationsrate verhielten sich auch im weiteren Verlauf des Versuches ähnlich den Zellen gesunder Kontrollpersonen. Nach einem Transformationswert von 45 % in der Sieben-Tage-Kultur fiel dieser Wert auf 20 % nach neun Tagen. Nach elf Tagen konnten wir weder Immunoblasten noch andere Zellen auf den Objektträgern erkennen.

Mit vergrößerten mediastinalen Lymphknoten gehörte der Patient Nr. 20 in das Stadium III der Erkrankung, obwohl hier die Diagnose erst fünf Monate vor Beginn unseres Versuches gestellt worden war. Seine Lymphozytentransformationswerte lagen zwar nach drei Tagen mit 29,0 % niedriger als die Transformationsrate eines Patienten im Stadium IV der Erkrankung, doch erreichten nach fünf Tagen die Blastenzahlen mit 67,5 % nahezu die Ergebnisse der Lymphozyten eines sich im Stadium II der Erkrankung befindenden Patienten. Nach sieben Kulturtagen fielen sie dann allerdings auf 24,0 % ab. Nach einer Kulturdauer von neun Tagen kommt es zu einem erneuten leichten Anstieg auf 29,o %, dem dann allerdings ein Abfall der Werte auf 0 %

in der elf Tage alten Kultur folgt. Die BSG dieses Patienten betrug 28/56 mm, das Gesamteiweiß 5,95g%, der γ-Globulinwert 20 rel.%. Behandelt worden war er mit Cytostatika und Bestrahlung. Von den Lymphozytenkulturen der Patienten, die sich im Stadium IV der Erkrankung befinden, weist die Kultur des Patienten Nummer 18 die höchsten Transformationsraten dieser Versuchsgruppe auf. Mit einer Blastenzahl von 55 % nach drei Tagen liegt diese Kultur mit ihrer Transformationsrate noch im Normbereich der Kontrollversuche anderer Autoren. Die Blastenzahlen fallen dann aber auf einen Wert von 30 % in der Fünf-Tage-Kultur ab. Nach sieben Tagen steigen sie auf 35 % an, nach neun Tagen betragen sie noch 18 % und nach elf Kulturtagen haben sie immer noch eine Größenordnung von 10 %. Erkrankt ist der Patient, dessen supraclaviculäre, inguinale, paraaortale, iliacale und hiläre Lymphknoten befallen sind, seit zwei Jahren. Die BSG ist auf 110/125 mm erhöht, das Gesamteiweiß beträgt 8,45 g% bei einem γ-Globulinwert von 34 rel.%. Behandelt wurde der Patient nicht. Die Patientinnen Nummer 15 und 16 waren beide seit drei Jahren erkrankt und befanden sich beide im Stadium IV. Doch während die Patientin Nummer 15, deren Allgemeinzustand reduziert war und die neben abdominalen Lymphknoten auch eine vergrößerte Leber hatte, kurze Zeit nach unserem Versuch verstarb, fühlte sich die Patientin Nummer 16, bei der keine vergrößerten Lymphknoten zu entdecken waren und nur die Milz leicht anstoßend gefunden wurde, wohl. Trotzdem war ihre Transformationsrate mit 9 % am dritten Kulturtag wesentlich geringer als die der Patientin Nummer 15, in deren Lymphozytenkultur wir nach drei Tagen 24 % Blasten fanden. Am fünften Kulturtag und auch im weiteren Verlauf des Versuches war die Transformationsrate mit 15 % wieder höher als die der Patientin Nummer 16 mit 13 % bzw 10 %.

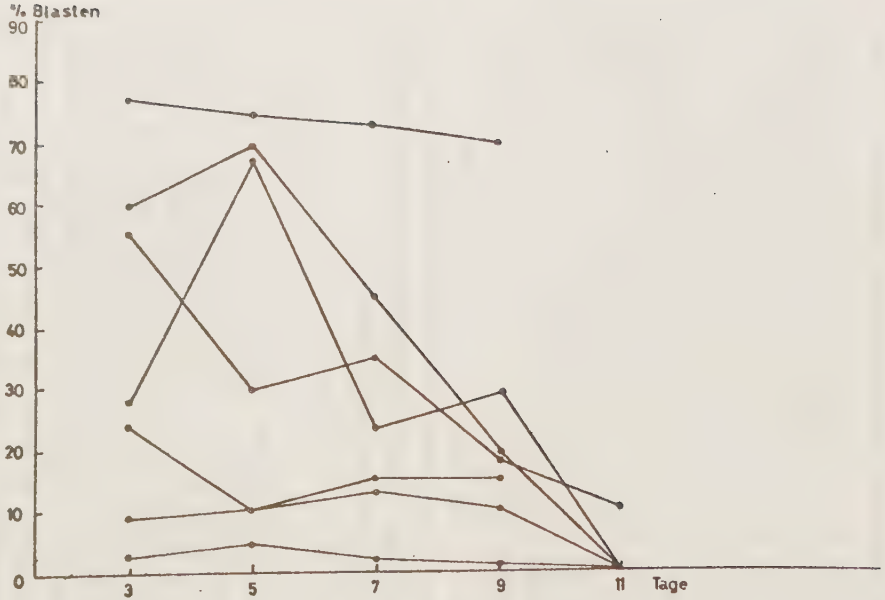
Die niedrigsten Transformationswerte aller unserer Lymphozytenkulturen mit 3 %, 6 %, 5 %, 2 % und 0 % nach jeweils 3, 5, 7, 9 und 11 Tagen fanden wir in der Kultur Nummer 21. Deren Lymphozyten stammen von einem erst seit 11 Monaten erkrankten Patienten. Mit erheblichen und sich rasch vergrößernden Drüsenpaketen gehörte er ins Stadium IV der Erkrankung, an der er kurze Zeit später verstarb. Der Gesamteiweißgehalt betrug 5,21 g%, die γ-Globline 10 rel.%, die BSK 50/90 mm. Behandelt worden war er mit Endoxan.

Die Zahl der transitional cells in dieser Versuchsgruppe beträgt nach drei Tagen im Mittel 4,7 % und nach fünf Tagen 7,8 %. Sie fällt nach sieben Kulturtagen auf 6,2 % ab, um dann, über 7,8 % am neunten Tag, auf 1,2 % am elften Tag abzusinken. Die Makrophagenwerte steigen von 4,2 % nach drei Tagen auf 5,7 % nach fünf Tagen und dann schließlich auf 28 % nach elf Tagen an. Ein ähnliches Verhalten von Makrophagen und transitional cells wie in unseren Kontrollversuchen findet sich auch hier nicht, sondern die Makrophagenzahlen steigen nach dem fünften Kulturtag stark an.

Auch die Transformationsergebnisse der Lymphozytenkulturen unserer an Lymphogranulomatose erkrankten Patienten sind im Anhang tabellarisch dargestellt.

D. Lymphosarkomatose

Von 49 % nach drei Kulturtagen fallen die Immunoblastenzahlen unseres einzigen an Lymphosarkomatose erkrankten Patienten über 28 % nach fünf Tagen auf 12 % am siebten Kulturtag ab. Dann aber steigt die Transformationsrate, wie bei den Versuchen mit Lymphozyten von an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten, wieder an und erreicht nach neun Tagen den recht hohen Wert von 31 %. Am elften Kulturtag wurden bei der lichtmikroskopischen Auswertung noch 7 % Immunoblasten gefunden.



Lymphogranulo-
matose

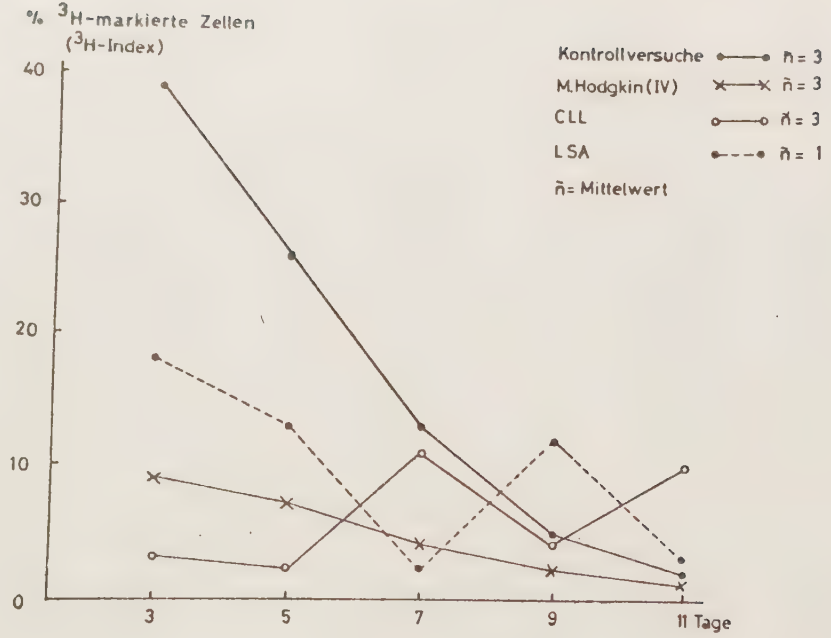
E. Thymidin-Markierung

Zur Kontrolle unserer Transformiationsergebnisse wurde eine zusätzliche Thymidin-Markierung durchgeführt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei Versuchen jeder Versuchsgruppe. Nur das Ergebnis unserer Kultur von Lymphozyten eines an Lymphosarkomatose erkrankten Patienten repräsentiert einen Einzelwert.

Autoradiographisch markiert wurden die Zellen der Kontrollversuche Nummer 5, 6 und 8. Von unseren Kulturen der Lymphozyten unserer an Lymphogranulomatose Erkrankten wurden die Versuche Nummer 16, 18 und 21 markiert, deren Spender sich alle im Stadium IV der Erkrankung befanden. Bei der Gruppe der chronisch lymphatischen Leukämie die Versuche Nummer 12, 13 und 14.

Die tabellarische Darstellung unserer Ergebnisse findet sich, geordnet nach unseren vier Versuchsgruppen im Anhang. Eine Erläuterung der Darstellungweise wird auf Seite 64 gegeben.

H^3-Thymidin markierte Zellen



V. DISKUSSION

A. Methode

Um das Schicksal von Homotransplantaten und die von ihnen hervorgerufenen Abwehrreaktionen zu erforschen, benutzen Algire und Prehn 1954 (ALGIRE et al. 1954, PREHN et al. 1954) Cellulosemembranen verschiedener Porengröße, die, zu kleinen Kammern geformt, der Aufnahme von Tumorzellen dienten und in die Peritonealhöhle von Mäusen implantiert wurden. Die Methode, die sie "Diffusionskammertechnik" nannten, führte zu folgenden Ergebnissen:

Die implantierten Zellen überlebten nicht nur, sondern vermehrten sich auch, während Zellen, die nicht von Diffusionskammern geschützt waren, zerstört wurden. Die implantierten Zellen immunisierten den Wirt nicht.

In weiteren Versuchen (WEAVER et al. 1955) stellten Algire und Prehn zusammen mit Weaver fest, daß Homotransplantate selbst in der Peritonealhöhle immunisierter Tiere bis zu 45 Tagen überlebten, solange sie keinen Kontakt mit Zellen des Wirtstieres hatten. In anderen Untersuchungen, die sich mit dem Schicksal von Heterotransplantaten befaßten, implantierten Algire, Borders und Evans (ALGIRE et al. 1958) Diffusionskammern, die mit menschlichen leukämischen Zellen gefüllt waren, in die Peritonealhöhle von Mäusen. Sie fanden zahlreiche intakte Zellen, wenn sie die Diffusionskammern vor Ablauf von 20 Tagen wieder entfernten.

Die Methode wurde von Amos und Wakefield aufgegriffen und ebenfalls auf ihre Brauchbarkeit hin untersucht (AMOS et al. 1958) Schooley und Berman (SCHOOLEY et al. 1960) benutzen die Diffusionskammertechnik, um Lymphozyten aus dem Ductus-Thoracicus von Ratten zu untersuchen.

Goldhaber (1958) sowie Berman und Kaplan (1959) implantierten mit Knochenmarkzellen gefüllte Kammern in die Peritonealhöhle von Mäusen. Wolf (1962) studierte mit ihrer Hilfe Hypophysengewebe, Parrish und Kleinfeld (1963) leukämisches Tumorgewebe.

Diese Autoren verwendeten durchweg Diffusionskammern mit einer Porengröße von 0,45 µ, die zellundurchlässig waren, während es Antikörpern möglich war, in die Kammern einzudringen. Daher schlossen Prehn (1954) und Algire (1957), daß Antikörper bei Homo- und auch Heterotransplantaten im wesentlichen an Zellen gebunden waren, die durch die Diffusionsmembran vom implantierten Gewebe abgehalten wurde. Wakefield und Amos (1968) allerdings zeigten, daß zahlreiche Neoplasmen in zellundurchlässigen Diffusionskammern bei immunisierten Tieren zerstört wurden.

Zu gleichen Ergebnissen kam in einer anderen Arbeit Algire (1959) beim Plasmazell-Neoplasma, wobei er die Schädigung dieses Gewebes auf eine besondere Empfindlichkeit gegenüber dem Serum des immunisierten Wirtstieres zurückführte. Dazu zitiert er Gorer (1956), der berichtet, daß einige Zelltypen als Homotransplantate direkt von Antikörpern angegriffen werden, während das bei anderen Zellarten hauptsächlich durch Leukozyten des Wirtstieres bewirkt wird.

Neben den Ergebnissen von Algire wird die Theorie von der zellulären Immunantwort auf ein Transplantat unterstützt von der Arbeit Brent's (1958), der fand, daß selbst große Serummengen keine Transplantationsimmunität gegen Hauttransplantate bewirken konnten. Durch die Ausschaltung der Lymphozytenwirkung konnte Woodruff (1964) die

Überlebenszeit eines Transplantates von 8 auf 31 Tage verlängern. Ebenfalls für die Theorie der zellulären Immunantwort sprechen Ergebnisse, die davon berichten, daß die Transplantationsimmunität durch lebende Zellen der regionären Lymphknoten passiv übertragen werden kann, wie es der in der Einleitung gegebenen Definition einer Reaktion vom Spättyp entspricht. (STEFFEN 1968)

Andere Autoren kommen zu Ergebnissen, welche für die humorale Reaktionsform sprechen. So wurden nach Implantation immunkompetenter Zellen, eingeschlossen in zellundurchlässige Diffusionskammern, Hauttransplantate beschleunigt abgestoßen (NAJARAN 1962). Bei Kaninchen mit Serumkomplementdefekten überlebten Hauttransplantate bis zu sechs Wochen, während die von Kontrolltieren innerhalb von 6 bis 9 Tagen abgestoßen wurden (VOLK 1964) Markierte Immunzellen, die nicht angehäuft am Ort eines Transplantates gefunden wurden, bekräftigen ebenfalls diese Theorie.

Neben der bereits von Gorer (1956) ausgesprochenen Bedeutung der Art des Transplantates und des von ihm freigesetzten Antigens für den Typ der Immunreaktion ist auch dessen Menge und Weg nicht unwichtig. Kleine Mengen sowie der Weg über die Lymphbahnen zu den regionären Lymphknoten sollen die Ausbildung einer zellulären Immunreaktion begünstigen, große Antigenmengen die Bildung von Antikörpern.

Auf Grund dieser Ergebnisse werden von Steffen (1968) für das Entstehen einer Immunreaktion bei Transplantaten sowohl Zellen als auch Antikörper verantwortlich gemacht, während Hitzig (1966) diesen keine große Bedeutung bei der Transplantatabstoßung zuschreibt. Weil der Reaktionsmodus (von Bedeutung für die Wahl der Porengröße) auf Grund der vorliegenden Befunde auch für eine Beteiligung von Antikörpern spricht und um

eine Immunisierung des Wirtstieres und ein Verhalten der implantierten Zellen im Sinne einer graft versus host reaction zu verhindern, wählten wir für unsere Versuche, im Gegensatz zu anderen Autoren, Diffusionsmembranen mit einer Porengröße von 0,1 µm. Diese Poren sind für Serumalbumin, das eine Länge von etwa 150 Å und einen Durchmesser von 38 Å hat, sowie für γ-Globuline, die einen Durchmesser von ungefähr 44 Å und eine Länge von 235 Å besitzen, nicht mehr durchgängig. Das zeigten auch Fuchs und Gorin in einer Untersuchung (1961). Nach Leuthardt scheint es im Blut keine Proteine zu geben, die kleinere Dimensionen als das Serumalbumin besitzen (LEUTHARDT 1968).

Algire, Borders und Evans (1956) stellten allerdings fest, daß die Zahl der überlebenden Zellen geringer war als in entsprechenden Kontrollversuchen, wenn sie Membranen mit einer Porengröße von 0,001 u verwendeten. Die Autoren führten ihr Ergebnis auf eine eingeschränkte Nährstoffzufuhr zurück. Diese kann entstehen, wenn eine Diskrepanz zwischen dem Nahrungsbedarf (der unter anderem abhängig ist von der Zellzahl) und der Diffusionsrate besteht, die unter anderem von der Membranoberfläche und Porengröße bestimmt wird. Eine eingeschränkte Nährstoffzufuhr kann aber auch entstehen, wenn bestimmte für die Zelle notwendigen Stoffe wegen der Porengröße nicht in die Kammer diffundieren können. Wir glauben, daß eine wesentliche Einschränkung der für eine Zelle wichtigen Stoffe als erstes zu einer Verminderung der Transformationsrate und der DNS-Synthese geführt hätte. Daß dieses nicht der Fall ist, zeigen die Ergebnisse unserer Kontrollversuche. Wenn wir trotzdem bei einigen unserer Versuche nach elf Kulturtagen nur wenige oder gar keine Zellen fanden, so lag das wohl daran, daß hierbei die Diffusionsoberfläche durch Auseinanderlegen von zwei Kammerseiten um die Hälfte eingeschränkt war oder die Kammer noch zu-

sätzlich, wie in den zwei Fällen, in denen wir nach elf Kulturtagen keine Zellen mehr fanden, von Gewebe des Wirtes umwachsen worden waren. Diese Erscheinung wurde auch von anderen Autoren beschrieben oder erwogen. (BERMAN et al. 1959, WEAVER et al. 1955, WOLF et. al. 1962) und von diesen als leichte Entzündungserscheinung gewertet. Auch wir stellten bei der Entnahme der Kammern fest, daß diese Umwachsungen besonders dann auftraten, wenn die Kammern vor dem Implantieren mit besonders vielen Keimen in Berührung kamen. Goldhaber (1958) beschreibt Zellfortsätze, die in die Poren der Diffusionsmembran eingedrungen sind, eine Möglichkeit, die auch von Wolf (1962) in Betracht gezogen wird und Algire (1957) erwägt, daß die Filterporen durch die Absorption von Protein blockiert werden könnten. Algire untersucht in zwei Arbeiten (ALGIRE 1957, ALGIRE et al. 1957) dieses Problem und stellt fest, daß die Membranen auch nach mehreren Kulturtagen für cytotoxische Antikörper durchgängig sind.

Auch in unseren Versuchen fanden wir nach allen Kulturtagen die Poren der Diffusionsmembranen zumindest für H^3-Thymidin durchgängig, wie die Markierung damit zeigt. Verkalkungen der Membran, wie sie von Stone (1962) beschrieben worden sind, konnten wir nicht feststellen. Goldhaber berichtet, daß sich die Zellen an den Innenwänden der Membranen anheften (GOLDHABER 1958). Aus diesem Grunde fertigten wir auch damit einen Ausstrich an, der jedoch in keinem Fall eine nennenswerte Ausbeute brachte.

Insgesamt betrachten wir die Diffusionskammer-Technik als einen guten Weg, Lymphozytenkulturen in vivo über den von uns gewählten Zeitraum durchzuführen. Sie bietet mit der von uns benutzten Porengröße bei keiner oder nur geringer Immunisierung den Vorteil, daß die

Kontrolle des ph-Wertes, die Zufuhr von Elektrolyten und Nährstoffen, aber auch der Abtransport von Stoffwechselprodukten und die Regelung der Temperatur vom Organismus des Wirtstieres bewirkt und damit auf einem während der ganzen Versuchsdauer konstanten und physiologischen Wert gehalten werden. Mit der Möglichkeit, mehrere Kapseln gleichzeitig zu implantieren, bietet sich eine Methode an, unter absolut gleichen Kulturbedingungen die Transformationsrate von Lymphozytenkulturen, die von unterschiedlichen Spendern stammen, zu studieren.

Aber auch für Vitro-Kulturen könnte die Benutzung der Diffusionskammern von Vorteil sein, da in sie eingebrachte Zellen ohne besondere Manipulationen etwa von einem Kulturmedium ins andere gebracht werden könnten.

8. Ergebnisse

1. Gesunde Kontrollpersonen

Die Ergebnisse unserer Kontrollversuche stimmen im wesentlichen mit denen anderer Untersucher überein. (ASTALDI 1968 und 1969, SCHEURLEN et al. 1968). Ihre Höhe mag bei den einzelnen Untersuchern durch die recht unterschiedliche Einstufung der Übergangsform oder transitional cells schwanken, die lichtmikroskopisch den Eindruck machen, zwischen Lymphozyten und Immunoblasten zu stehen (ORFANOS et al. 1969) und sich

im weiteren Verlauf der Kultur zu vollkommen transformierten Zellen zu entwickeln. Trotzdem wurde diese Zellgruppe in Anlehnung an Scheurlen (1968) gesondert aufgeführt. Denn er geht von der Überlegung aus, daß zwar auch diese Zellen aktiviert sind, aber in diesem Stadium nicht entschieden werden kann, ob sie sich zu Immunoblasten oder Makrophagen entwickeln werden. Hersh (1968) wie auch Rabinowitz und Schrek (1962) sowie Lennert (1966) vertreten die Meinung, daß sich Makrophagen aus den Monozyten des peripheren Blutes entwickeln. Lennert berichtet dazu über Versuche von Rabinowitz und Schrek, in denen diese Autoren zeigten, daß röntgenbestrahlte und darum lymphozytenfreie Leukozytenkonzentrate ebensoviele Makrophagen bildeten wie unbestrahlte.

Elves (1965), Gropp und Fischer (1966), Gough (1965) sowie Berman und Stulberg (1962) vertreten, gestützt auf Übergangsformen, die sich in Leukozytenkulturen fanden, die Theorie von der lymphozytären Herkunft der Makrophagen, die nach neueren elektronenoptischen Untersuchungen, bei denen sie ebenfalls fließende Übergänge zwischen PHA-stimulierten Zellen und Makrophagen fanden, auch von Orfanos und Pappas in Betracht gezogen wird (ORFANOS et al. 1969).

Interessant dürfte daher das Verhalten von transitional cells und Makrophagen in unseren Kontrollversuchen sein, in denen die Gesamtzahl beider Zellformen über mehrere Kulturtage bei Abnahme der ersten und Zunahme der zweiten nahezu konstant bleibt und so an einen Zusammenhang zwischen beiden denken läßt. Allerdings gilt dies nicht für unsere an Morbus Hodgkin erkrankte Versuchsgruppe. Hier nimmt die Zahl der Makrophagen, wie auch von anderen Autoren beobachtet wurde (SCHEURLEN et al. 1968), im Verlauf des Versuches stark zu. Im Gegensatz dazu fanden wir in den Kulturen von Lymphozyten unserer an

chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten keine Makrophagen bis auf einen Versuch, der eine große Makrophagenzahl aufwies. Dieser Befund scheint die Ansicht Hulligers (1956), der berichtet, daß eine Makrophagenbildung um so seltener stattfindet, je mehr Lymphozyten das Ausgangsmaterial enthält, zu bestätigen. Für die lymphozytäre Herkunft der Makrophagen spricht jedoch die morphologische Ähnlichkeit, die auch von anderen Autoren festgestellt wurde, so daß wir aufgrund unserer Befunde keine eindeutige Stellungnahme zu diesem Problem nehmen können.

2. Chronisch lymphatische Leukämie

Lymphozytenkulturen von an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten weisen nach drei Tagen, wie mehrere Autoren berichten (BOURONCLE et al. 1969, GROPP et al. 1969, HEINE et al. 1969, PAPPAS et al. 1969), eine verringerte und unterschiedliche Transformationsrate auf. Auch wir erhielten nach dieser Zeit niedrigere Werte als in unseren Kontrollversuchen. Im weiteren Verlauf der Kultur allerdings kommt es zu einem ersten Transformationsgipfel nach fünf Tagen und einem weiteren nach sieben Kulturtagen.

Dieser Transformationsverlauf, der auch von anderen Autoren beschrieben wurde (BOURONCLE et al. 1969, RUBIN et al. 1969), wird von einigen auf das Vorhandensein einer in ihrer Gesamtheit geschädigten Lymphozytenpopulation zurückgeführt (RIGAS et al. 1955, RUBIN et al. 1969). Die Mehrzahl der Autoren allerdings (BOURONCLE et al. 1969, GROPP et al. 1969, OPPENHEIM et al. 1965) schließt sich der Auffassung Bernards (1964) und auch Damashek (1967) an. Dieser führt die unterschiedliche Ansprechbarkeit auf ein Nebeneinander-

bestehen einer normalen sowie einer leukämischen Zellpopulation zurück. Neben gesunden Lymphozyten, die durch ihre Beteiligung an immunologischen Reaktionen einer ständigen Erneuerung unterliegen, kommt es, durch einen vielleicht genetisch begründeten Prozeß, zur Bildung immunologisch inkompetenter Zellen. Diese sind nach Dameshek nicht beteiligt am immunologischen Geschehen und werden darum nicht verbraucht, sie häufen sich im Organismus an und führen zu einer zunehmenden Verdrängung der normalen Lymphozytenklone.

Unsere Ergebnisse, die zeigen, daß die pathologischen Lymphozyten von an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten nicht nur in verringertem Maße, sondern auch in verzögertem Maße auf PHA reagieren, sprechen ebenfalls für diese Hypothese. Die dabei nach drei Tagen auftretenden Blasten führen wir auf eine Transformation der normalen oder annähernd normal reagierenden Zellen zurück. Diese Ansicht wird auch von anderen Autoren vertreten (BOURONCLE et al. 1969). Daß die im weiteren Verlauf der Versuche gefundenen Immunoblasten nicht auf einer Transformation normaler Zellen beruhen, die sich durch Anwesenheit der pathologischen Lymphozyten nur verzögert umwandeln, sondern auf eine durch das PHA bedingte Reaktion defekter Zellen zurückzuführen sein könnte, vermutet Havemann et al. (1968 a).

Auf Grund unserer Ergebnisse und ihrer Deutung, zu der auch Bouroncle et al. (1969) für ihre Versuche gelangen, geben die Beobachtungen anderer Autoren (GROPP et al. 1969, HEINE et al. 1969) nach dem üblichen Zeitraum von drei Tagen keinen Aufschluß über die Reaktion der pathologischen Lymphozyten bei dieser Erkrankung, sondern machen nur eine Aussage über die Zahl der normal oder annähernd normal reagierenden Zellen. Da die Transformationsraten in Prozentwerten ausge-

drückt sind, ist es verständlich, daß diese mit der zunehmenden Anhäufung pathologischer Lymphozyten bei fortschreitender Erkrankung geringer werden. Die unterschiedlichen Ergebnisse nach drei Kulturtagen, die nicht immer ein reziprokes Verhältnis zwischen Blutleukozytenwerten und Immunoblasten aufwiesen, lassen aber vermuten, daß auch noch andere Faktoren die Transformation beeinflussen. Hierbei könnte man an eine Abnahme der reaktionsfähigen Lymphozyten auch in frühen Krankheitsstadien oder an eine Transformierung nur gering geschädigter Lymphozyten denken.

Rubin, Havemann und Dameshek (1969) fanden in ihren Untersuchungen eine Korrelation zwischen Grad und Verzögerung der Transformation sowie Lymphozytenzahlen des peripheren Blutes, Immunoglobinspiegel und Grad der Erkrankung. Solche Beziehungen wurden immer wieder festgestellt (BOURONCLE et al. 1969, GROPP et al. 1969, SCHEURLEN 1967), konnten aber von anderen Autoren nicht bestätigt werden (ASTALDI et al. 1969, SCHEURLEN et al. 1968). Auch wir untersuchten unsere Ergebnisse in dieser Richtung ohne Erfolg. Zwar weist nach drei Tagen die Kultur der Patientin mit der niedrigsten Blutlymphozytenzahl (Versuchsnummer 10) die höchste Transformationsrate auf, doch schon bei der zweithöchsten Immunoblastenzahl waren solche Parallelitäten nicht mehr zu entdecken. Ebenso geringe Beziehungen fanden wir zwischen Lymphknoten- und Milzgröße einerseits und den Transformationsergebnissen andererseits, obwohl Bouroncle und Mitarbeiter (1969) Parallelen beschrieben. Allerdings machten diese Autoren ihre Beobachtungen an derselben Patientengruppe vor und nach der Behandlung. Sicherlich wird es auch für ein unterschiedliches Patientengut eine dem Grad und der Verzögerung der Lymphozytentransformation entsprechende Größe geben, diese ist aber wohl Ausdruck der Gesamterkrankung, deren Komplexität in der Berücksichtigung von Symptomen wie Milzgröße und periphere Leukozyten-

zahl keine ausreichende Berücksichtigung findet.

Dameshek (1967), Bouroncle (1969) sowie Heine und Mitarbeiter beschreiben den Einfluß der Therapie auf den Verlauf der Lymphozytentransformation und stellen eine prompter (DAMESHEK 1967) und höhere Transformierung nach einer spezifischen medikamentösen und strahlentherapeutischen Behandlung fest. Andere Autoren berichten ähnliches (ASTALDI et al. 1968, SCHREK 1967).

Der Anstieg der relativen Immunoblastenzahlen wird auf eine erhöhte Empfindlichkeit der pathologischen Lymphozytenpopulation gegenüber der Behandlung zurückgeführt (BOURONCLE et al. 1969, DAMESHEK 1967), die dadurch eliminiert wird, während die reaktionsfähigen normalen Lympho - zyten nicht oder nicht wesentlich geschädigt und in ihrer Zahl vermindert werden (HEINE et al. 1968). Die Ergebnisse unserer Versuche scheinen das zu bestätigen. So weisen die Lymphozyten der behandelten Patienten nach drei Tagen eine höhere Transformationsrate auf als die der unbehandelten Patienten. Auch die Ergebnisse des weiteren Kulturverlaufs könnten für eine Elimination der verzögert reagierenden Zellen sprechen, denn die Immunoblastenzahlen von behandelten Patienten erreichen bereits nach fünf Tagen ihre Maximalwerte, während die unserer zwei unbehandelten Patienten erst am siebten Kulturtag ihre höchsten Werte erreichen. Bei ihnen könnte der größte Teil der Blutlymphozyten aus nur schwer transformierbaren Zellen bestehen.

Nicht in dieses Schema lassen sich die Ergebnisse der Kulturen von zwei behandelten Patienten einordnen. Während man den nur geringen Anstieg der Transformationswerte nach neun Kulturtagen durch große Lymphozytendefekte erklären könnte, die sich im Verlauf der seit 15 Jahren bestehenden Erkrankung gebildet haben könnten (Versuchsnummer 9), fehlen für die Ergebnisse des

anderen Versuches (Versuchsnummer 10) alle Erklärungsmöglichkeiten. Die Ergebnisse verschiedener Autoren zeigen, daß die pathologischen Lymphozyten von an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten zwar, wann auch verzögert und verringert, auf PHA reagieren, ob sie aber auch am immunologischen Reaktionsablauf teilnehmen, ist nicht eindeutig geklärt. Es ist sicher denkbar, daß der Transformationsprozeß bei diesen Zellen an irgendeiner Stelle zum Stillstand kommt. Die wenigen Mitosen, die wir in unseren Versuchen fanden und die trotz höherer Transformationsrate im späteren Verlauf der Versuche nur nach drei und fünf Tagen zu finden waren, an denen die normalen Zellen reagiert haben könnten, ließen darauf schließen.

3. Lymphogranulomatose

Während wir bei den an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten keine Beziehungen zwischen den Transformationsergebnissen ihrer Lymphozytenkulturen und dem Grad der Erkrankung feststellen konnten, werden diese bei den an Lymphogranulomatose Erkrankten vollkommen deutlich.

Es zeigt sich, daß der Transformationsverlauf vom Stadium der Erkrankung abhängig ist, die Patienten im Stadium II der Erkrankung weisen einen annähernd den Ergebnissen der Kontrollversuche entsprechenden Transformationswert auf, während die Immunoblastenzahlen am niedrigsten in den Kulturen der Patienten sind, die sich im Stadium IV der Erkrankung befinden. Die Transformationsergebnisse von Lymphozyten der Patienten im Stadium III liegen zwischen diesen beiden.

Damit können wir die Ergebnisse anderer Autoren bestätigen, die ebenfalls eine Abhängigkeit der Transformationswerte vom Krankheitsstadium nachwiesen (ASTALDI et Al. 1968, ASTALDI et al. 1969, JACKSON et al. 1970,

SCHEURLEN et al. 1966). Doch sind einige Untersucher auch anderer Ansicht (THOMAS et al. 1967). Die verringerte Reaktion der Lymphozyten von an Morbus Hodgkin Erkrankten auf PHA wird von Trubowitz (1966) auf einen plasmatischen Faktor zurückgeführt. Die gleiche Ansicht vertreten auch Pappas und Scheurlen (1968). Sie stellten fest, daß das Plasma Hodgkinkranker die Transformation von gesunden Lymphozyten um so stärker hemmt, je fortgeschrittener die Erkrankung des Plasmaspender ist. Hodgkin-Lymphozyten andererseits wiesen höhere Transformationswerte auf, wenn sie dem Plasma gesunder Personen kultiviert wurden. Andere Autoren führen die verminderte Reaktion auf einen zellulären Defekt der Hodgkin-Lymphozyten zurück (JACKSON et al. 1970, RUBIN et al. 1967). Auf Grund unserer Versuchsanordnung können wir keine Aussage über die Bedeutung eines Plasmafaktors von Hodgkinkranken als Hemmfaktor bei der Lymphozytentransformation machen, doch scheint er zumindest nicht allein von Bedeutung zu sein.

Unsere Ergebnisse weisen in mehreren Fällen ein erneutes Ansteigen der Transformationswerte nach fünf oder sieben Kulturtagen auf, so wie es für die chronisch lymphatische Leukämie bereits beschrieben wurde. Wie bei dieser Erkrankung könnte dieses Verhalten auch beim Morbus Hodgkin für eine unterschiedliche Lymphozytenpopulation aus normalen und pathologischen Zellen und damit für einen zellulären Faktor, der für die verminderte Immunoblastenbildung verantwortlich ist, sprechen. Ein Hinweis auf eine unterschiedlich zusammengesetzte Lymphozytenpopulation, wie bei der chronisch lymphatischen Leukämie, wurde bereits von Rubin (1967) gegeben, der nach RNS-Markierung an Hodgkin-Lymphozyten zu dieser Ansicht kam.

Der Grad der Transformation in Prozenten wäre nach dieser Theorie unter anderem abhängig von der Anzahl

der pathologischen Zellen, deren Menge mit fortschreitender Erkrankung größer werden könnte.

Obwohl eine zunehmende Lymphopenie eng verbunden ist mit dem Fortschreiten der Erkrankung, konnte von Hersh und Mitarbeitern (1968) keine Beziehung zwischen der Transformationshöhe und der Anzahl der Lymphozyten festgestellt werden. Auch wir fanden in unseren Versuchen keinen Hinweis darauf. Zu einer genaueren Untersuchung dieses Problems eignen sich aber unbehandelte Patienten sicherlich besser. Daß die Lymphozytopenie nicht in wesentlichem Maße und wahrscheinlich nur in späten Krankheitsstadien an dem verzögerten Ausfall der Hautreaktionen bei der Überempfindlichkeit vom Spättyp beteiligt ist, zeigen die verringerten Transformationswerte auch bei nahezu normalen peripheren Zellwerten.

Aus den Ergebnissen unserer Versuche lassen sich keine Beziehungen zwischen Gammaglobulinspiegel, BSG oder Behandlung einerseits sowie Immunoblastenzahl andererseits erkennen. Um darüber Aussagen machen zu können, wäre ein größeres Untersuchungsgut erforderlich gewesen.

Interessant sind die Ergebnisse der Kultur Nummer 17, Sie weist nicht nur eine vollkommen normale Transformationsrate nach drei und fünf Kulturtagen, sondern auch eine wesentlich höhere als die unserer Kontrollversuche im weiteren Kulturverlauf auf. Die hohen Ergebnisse lasses es unwahrscheinlich erscheinen, daß sich noch am siebten Kulturtag neue Zellen zu Immunoblasten transformieren und es entsteht der Eindruck, daß diese ungewöhnlich hohe Transformationsrate, die auch von einem Kontrollversuch erreicht wird, auf ein verlängertes Verweilen der Zellen im Blastenstadium zurückzuführen ist.

Denkbar ist allerdings auch, daß es durch irgendwelche Vorgänge zum Absterben der nicht transformierten Zellen und damit zu einem vermeintlichen Anstieg der Transformationsrate gekommen ist. Douglas und Mitarbeiter weisen auf diese Möglichkeit hin (1969).

4. Lymphosarkomatose

Über die Transformation von Lymphozyten von an Lymphosarkomatose erkrankten Patienten bestehen in der Literatur die gegensätzlichsten Angaben. Elves (1966) und Trubowitz (1966) sowie Hirschhorn (1964 a) fanden keine unterschiedliche Reaktion zu Lymphozyten Gesunder, während von Quaglino und Cowling (1968) und auch von uns eine verminderte Reaktion auf PHA festgestellt wurde. Trotzdem ist die Transformation zu Immunoblasten wesentlich größer als die bei der nahe verwandten chronisch lymphatischen Leukämie. Ein gemeinsames Auftreten mit dieser wird von Astaldi (1968) auch bei der Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse erwogen und für deren Entstehen verantwortlich gemacht. Unsere Ergebnisse können durch ihren Verlauf, mit einem zweiten verzögerten Ansteigen der Transformation wie bei der chronisch lymphatischen Leukämie, diese Theorie unterstützen. Doch bedarf es zu genaueren Aussagen noch weiterer Untersuchungen.

5. Mitosen und Thymidin-Markierung

Der Mitoseindex kann als Bestätigung der von uns erhaltenen Transformationsergebnisse gewertet werden. Er stimmt in seinem Verlauf annähernd mit den Immunoblastenzahlen der Lymphozyten unserer gesunden und an Morbus Hodgkin

erkrankten Versuchspersonen überein. Andere Autoren erhielten zum Teil höhere Werte (SCHEURLEN et al. 1968), mit weiteren stimmen unsere Ergebnisse überein (AURICH et al. 1969).

Bei unseren an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten fällt jedoch auf, wir wiesen bereits darauf hin, daß trotz höhere Transformationsrate am fünften und siebten Kulturtag der Mitoseindex nicht mehr ansteigt. Eine mögliche Deutung dieses Verhaltens wurde bereits gegeben.

Die Ergebnisse der Thymidin-Markierung bestätigen die bereits durch die lichtmikroskopische Auszählung der Präparate erhaltenen Werte, so daß sie keiner weiteren Erläuterung bedürfen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Beurteilung der immunologischen Kapazität bei Patienten mit lympho- und retikuloproliverativen Erkrankungen implantierten wir Lymphozyten, die sich in zellundurchlässigen, semipermeablen Kammern befanden, in die Peritonealhöhle von Ratten und beließen sie hier über eine Zeitspanne von 3, 5, 7, 9 und 11 Tagen. Untersucht wurden die Leukozyten von acht gesunden Kontrollpersonen, von sechs an chronisch lymphatischer Leukämie sowie von sieben an Lymphogranulomatose erkrankten Patienten. Ein Patient war an Lymphosarkomatose erkrankt.

In den Lymphozytenkulturen unserer Kontrollpersonen fanden wir nach drei Tagen eine mittlere Transformationsrate von 80,4 %. Nach neun bzw. elf Kulturtagen waren noch 46,1 bzw. 33,6 % Immunoblasten zu finden. Makrophagen traten in der Regel ab neunten Kulturtag auf und erreichten ihr Maximum am elften Kulturtag. Während sie zunahmen, verminderte sich die Zahl der transitional cells etwa im gleichen Maße.

Die Transformationsraten der Lymphozyten unserer an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten sind wesentlich geringer. Die Kulturen unserer behandelten Patienten erreichen ihr Transformationsmaximum am fünften Kulturtag, die unserer nicht behandelten Patienten (Nummer 12 und 13) am siebten Kulturtag. Zwei Versuche lassen sich nicht in dieses Schema einordnen. Beziehungen zwischen klinischen Daten und Transformationsergebnissen konnten nicht gefunden werden. Makrophagen fanden sich nur in einem Versuch (Nummer 14).

Bei den Lymphozytenkulturen unserer an Lymphogranulomatose erkrankten Patienten finden wir in einigen Fällen das Transformationsmaximum nach fünf oder sieben Tagen, in drei Fällen ein nochmaliges Ansteigen der Immunoblastenwerte,

nachdem diese bereits ihr Maximum erreicht haben. Es zeigt sich eine klare Beziehung der Transformationsergebnisse zum Stadium der Erkrankung; eine Abhängigkeit der Immunoblastenwerte von den klinischen Daten war nicht festzustellen. In dieser Versuchsgruppe steigen die Makrophagenwerte nach dem fünften Kulturtag stark an. Die Lymphozytenkultur unseres an Lymphosarkomatose erkrankten Patienten weist ebenfalls zwei Gipfel auf. Die Ergebnisse der zur Kontrolle zusätzlich durchgeführten Thymidin-Markierung entsprechen in ihrem Verlauf den durch lichtmikroskopische Beurteilung der Zellform zustande gekommenen Ergebnissen.

In der Diskussion der Methode wird über vorausgegangene Arbeiten mit Diffusionskammern berichtet und an Hand dieser Arbeiten der immunologische Mechanismus bei dieser Versuchsanordnung diskutiert. Die Wahl der Porengröße unserer Diffusionsmembranen wird begründet und auf das Ernährungsproblem der implantierten Zellen eingegangen. Befunde anderer Autoren bei Anwendung dieser Methode erwähnt und mit unseren Erfahrungen verglichen. Die Diffusionskammer-Methode wird als brauchbares Modell zur Lymphozytenkultivierung in vivo über einen längeren Zeitraum empfohlen.

In der Diskussion der Ergebnisse wird auf die Beziehungen zwischen transitional cells und Makrophagen eingegangen und besonders deren Herkunft diskutiert.
Der verringerte und unterschiedliche Transformationsverlauf der Lymphozytenkulturen unserer an chronisch lymphatischer Leukämie erkrankten Patienten wird diskutiert und die Vermutung geäußert, daß dieses Verhalten auf dem Nebeneinanderbestehen einer normalen und pathologischen Lymphozytenpopulation beruht. Ein Einfluß der Therapie auf die Transformationsrate wird für möglich gehalten.

Bei der Lymphogranulomatose stellten wir eine Abhängigkeit vom Stadium der Erkrankung fest und zitierten dazu andere Autoren. Wir gingen auf die Bedeutung eines Plasmafaktors ein, äußerten jedoch die Vermutung, daß dieser nicht allein maßgeblich sei. Es wurde in Erwägung gezogen, daß in einem Fall unserer Versuche die Blasten verlängert in diesem Stadium verweilen.

VII. ANHANG - KASUISTIK

Tabellarische Wiedergabe der klinischen Daten

und Versuchsergebnisse

A. Tabellarische Darstellung der klinischen Daten

Eine im Folgenden dargestellte Übersicht, angeführt von einem kurzen Hinweis auf die Kontrollversuche mit den Versuchsnummern 1 bis 8, gibt Aufschluß über die klinischen Daten der an chronisch lymphatischer Leukämie (Versuchsnummern 9 - 14) und Lymphogranulomatose erkrankten Patienten. In der linken oberen Ecke sind die Versuchsnummer, das Geschlecht der Versuchsperson, das Alter sowie der Tag des Versuches wiedergegeben, in der rechten oberen Ecke findet sich die Diagnose, die Dauer der Erkrankung sowie bei der Lymphogranulomatose zusätzlich das Stadium der Erkrankung.

Einer kurzen Darstellung des klinischen Bildes folgen Hinweise auf einen eventuellen Milztumor und falls vorhanden, die Lokalisation von Lymphknotengruppen. Da wir für unsere Arbeit aufwendigere Laborarbeiten nicht anstellen konnten, waren wir zum Teil auf ältere Angaben angewiesen. Ein Vergleich zwischen Datum der Laborwerte und Tag des Versuches erlaubt Rückschlüsse auf deren Aktualität. Alle Daten wurden den Krankenblättern entnommen und sind in den in der Klinik gebräuchlichen Abkürzungen und Dimensionen wiedergegeben.

Unter Frühbehandlung verstehen wir eine Therapie, die nicht länger als bis sechs Wochen vor Versuchsbeginn andauert, alle darauf folgenden Behandlungsarten werden unter "jetzige Behandlung" aufgeführt.

1. Gesunde Kontrollpersonen

Versuchsnummern: 1 - 8 Kontrollversuche

Über diese Personengruppe liegen keine Daten vor. Fünf der Versuchspersonen waren männlich, drei (Versuchsnummern 3, 6 und 7) weiblich.

2. Chronisch lymphatische Leukämie

Versuchsnummer: 9 Diagnose: chronisch lymphatische Leukämie

Tag d. Versuchs: 24. 1. 69 seit 15 Jahren

männlich, 68 Jahre

Aufnahme wegen rasch zunehmender Milzvergrößerung und Entleerung von Teerstühlen. Leber überragt Rippenbogen um 9 cm.

Lymphknoten: nicht festzustellen

Milztumor: bis ins kleine Becken reichend

Blutstatus:					
21. 1. 69	Leuko.	7 800	Ery.	3.1	Mill.
	Stabk.	3%	Hgb.	9.4	g%
	Segmk.	17%	Hämatokr.	30	
	Lympho.	80%	Retikul.	11,0	‰
	Monoz.		BSG	3/7	mm

Sonstige Laborwerte:

21. 1. 69				
	SGOT	36 mU/ml	Alk. Phosph.	45 mU/ml
	SGPT	40 mU/ml	Saure Phosph.	3,9mU/ml
	LDH	201 mU/ml	Harnsäure	7,66

Elektrophorese:

21. 1. 69		
	Ges.-Eiweiß:	5,4 mg%
	Albumine	58,0 rel.%
	Glob. α 1	6,0 rel.%
	Glob. α 2	12,0 rel.%
	Glob. β	12,0 rel.%
	Glob. γ	12,0 rel.%

Frübehandlung:

Leukeran

Jetzige Behandlung:

Gamma-venin

Versuchsnummer: 1o
Tag d. Versuchs: 17. 1. 69
weiblich, 47 Jahre

Diagnose: chronisch lymphatische Leukämie
seit: 7 Jahren

Leicht reduzierter Allgemeinzustand, deutliche Blässe, leichte Zyanose. Im Bereich der Extremitäten zahlreiche Hämatome. Leichter Diabetes mellitus.

Lymphknoten: Submandibulär, nuchal, axillar, retroperitoneal derb und indolent, gut verschieblich, Mandelgröße

Milztumor: 8 - 9 Querfinger

Blutstatus: 14. 1. 69

Leuko	4 300	Ery	4.3 Mill.
Stabk.	8 %	Hgb.	14.o g%
Segm.	37 %	Hämatokr.	41.o %
Lympho.	35 %	Thrombo.	51 ooo
Monoz.	14 %	BSG	3/6
Eosin.	6 %		

Elektrophorese: 6. 1. 69

Alb.	66.o rel.%
Glob.α 1	6.o rel.%
Glob.α 2	11.o rel.%
Glob.β	14.o rel.%
Glob.γ	3.o rel.%

Sonstige Laborwerte: .6. 1. 69

SGOT-	23.o mU/ml
SGPT-	49.o mU/ml
GLDH-	1.93mU/ml

Sternalpunktat: 6. 1. 69

Zellgehalt:	unauffällig
Erythropoese:	relativ gut erhalten
Granulozytopoese:	weitgehend verdrängt durch meist jüngere Lymphozyten
Übr.Zellsystem:	weitgehend verdrängt
Zusammen:	chronisch lymphatische Leukämie bei noch gut erhaltener Erytropoese

Frühbehandlung: Leukeran, Röntgentiefenbestrahlung der Milz, Prednison

Jetzige Behandlung: Urbason, Gammavenin, Milzbestrahlung, Antibiotika

Versuchsnummer: 11 — Diagnose: chronisch lymphatische Leukämie
Tag d. Versuchs: 6. 3. 69 — seit: 9 Jahren
männlich, Alter 53

Dyspnoe und Schüttelfrost, mäßiger Allgemeinzustand und Ernährungszustand, Schwächegefühl.

Lymphknoten: Nuchal, axillar, inguinal, Verklumpung beider Hili. Leber 1 - 2 querfinger unter Rippenbogen

Milztumor: Milz 3-querfinger vergrößert

Blutstatus: 3. 3. 69

Leuko.	18 200	Ery.	3.6 Mill.
Stabk.	5 %	Hgb.	1o.9 g%
Segmk.	15 %	Hämatokr.	34
Lympho.	71 %	Retikul.	11.o %o
Monoz.	2 %		
Jugend.	6 %		

Elektrophorese: 3. 3. 69

Ges.-Eiweiß:	5.75 mg%
Alb.	53.o rel.%
Glob. α 1	9.o rel.%
Glob. α 2	16.o rel.%
Glob. β	11.o rel.%
Glob. γ	11.o rel.%

Sonstige Laborwerte: 3. 3. 69

SGOT	1o.3 mU/ml	Alk. Phosph.	1o7 mU/ml
SGPT	4.9 mU/ml	Saur.Phosph.	o.9mU/ml
LDH	136.o mU/ml	Na.	136.o mg%
		Ka.	3.68 mg%

Sternalpunktat: 3. 3. 69

Zellgehalt:	vermindert
Erythropoese:	stark herabgesetzt und durch lymphozyt. Elemente verdrängt, Ausreifung nicht gestört
Granulozytopoese:	stark herabgesetzt, weitgehend durch lmyph. Infiltrate verdrängt
Übr. Zellsysteme:	Megacaryozyten vermindert, starke Vermehrung der Lymphozyten und Vorstufen

Frühbehandlung:

5 mg Ultracorten/d

Jetzige Behandlung:

Reverin, Terramycin, Ultracorten

Versuchsnummer: 12 — Diagnose: chronisch lymphatische Leukämie
Tag d. Versuches 8. 12. 69 — seit: 1 Monat
männlich, 48 Jahre

Keine Beschwerden

Lymphknoten: Axillar, inguinal, nuchal und paraaortal

Milztumor: Milz 3 cm vergrößert

Blutstatus: 8. 12. 69

Leuko.	81 ooo	Ery.	3.9	Mill
Segmk.	7 %	Hgb.	13.o	g%
Lympho.	89 %	Hämatokr.	38	%
Monoz.	2 %	Retik.	5	%o
Eosin.	2 %	Thromb.	11o	000

Elektrophorese: 22. 11. 69

Ges. Eiweiß:	5.82
Albumine	53.o rel.%
Glob. α 1	5.o rel.%
Glob. α 2	16.o rel.%
Glob. β	16.o rel.%
Glob. γ	1o.o rel.%

Sonstige Laborwerte: 22. 11. 69

SGPT	16.6 mU/ml	Alk. Phosph.	121 mU/ml
LDH	154.o mU/ml		

Sternalpunktat: Chronisch lymphatische Leukämie mit diffuser Markdurchsetzung

Frühbehandlung: keine

Jetzige Behandlung: keine

Versuchsnummer: 13 Diagnose: chronisch lymphatische
Tag d. Versuchs: 12. 1. 70 Leukämie
männlich, 59 Jahre seit: 4 Jahren

Wohlbefinden

Lymphknoten: keine Lymphome nachweisbar

Milztumor: kein Milztumor

Blutstatus:				
27. 1o. 69	Leuko. 1o6 ooo		Ery.	4.6 Mill.
	Segmk.	1 %	Hgb.	15.3 g%
	Lympho.	4o %	HBE	33
	Gumprecht		Thromb.	124 000
	Schatten	59 %		

Elektrophorese:

12. 1. 70		
	Ges.-Eiweiß:	6.15 g%
	Albumine	63.o rel.%
	Glob. α 1	5.o rel.%
	Glob. α 2	7.o rel.%
	Glob. β	13.o rel.%
	Glob. γ	12.o rel.%

Sonst. Laborwerte:
12. 1. 70 keine Markanteile für Beurteilung

Frühbehandlung:
keine

Jetzige Beschwerden:
keine

Versuchsnummer: 14 Diagnose: chronisch lymphatische Leukämie
Tag d. Versuche: 6. 2. 70
weiblich, 55 Jahre

Oberbauchbeschwerden, Müdigkeit, Kopfschmerzen

Lymphknoten: Iliacal, axillar, inguinal, nuchal, supraclavicular, prae- und paratracheal

Milztumor: kein Milztumor

Blutstatus:

Leuko.	192 700	Ery.	4.6 Mill.
Segm.	4 %	Hgb.	13.5 g%
Lympho.	96 %	Hämatokr.	44 %
Gumprecht.		Retik.	lo ‰
Schatten	45 %	Thrombo.	132 000

Elektrophorese: 3. 2. 70

Ges.-Eiweiß:	6.14	g%
Albumine	64.o	rel.%
Glob. α 1	4.o	rel.%
Glob. α 2	lo.o	rel.%
Glob. β	11.o	rel.%
Glob. γ	11.o	rel.%

Sonstige Laborwerte: 3. 2. 70

SGOT	9.9	mU/ml	Alk. Phosph. 168 mU/ml
SGPT	8.2	mU/ml	
LDH	11o	mU/ml	

Sternalpunktat: 4. 2. 70

Zellgehalt:	deutlich gesteigert
Erythropoese:	zurückgedrängt
Granulozytopoese:	zurückgedrängt
Übr. Zellsysteme:	Massive Durchsetzung mit Lymphozyten

Frühbehandlung:

Myleran, Megacillin

Jetzige Behandlung:

Leukeran, Steroide

3. Lymphogranulomatose

Versuchsnummer: 15 — Lymphogranulomatose
Tag d. Versuchs: 24. 2. 69 — seit: 3 Jahren, IV
weiblich, 74 Jahre

Müdigkeit, Gewichtsabnahme, reduzierter Allgemeinzustand, Haut blass, Ödeme präsacral, prätbial, abdominelle Beschwerden. Lebervergrößerung um 8 cm.
Tod am 6. 3. 69 an Lungenödem.

Lymphknoten: Abdominal

Milztumor: Milz nicht vergrößert

Blutstatus:

Leuko.	5 000	Ery.	2,8 Mill.
Segm.	59 %	Hgb.	8,2 g%
Stabk.	13 %	Hämatokr.	30,0 %
Lympho.	21 %	Retik.	8,0 ‰
Jugen.	1 %	Thromb.	101 000
Monoz.	6 %	BSG	30/61 mm

Elektrophorese: 18. 2. 69

Ges.-Eiweiß:	5,9 g%	
Albumine	56.o	rel.%
Glob. α 1	7,o	rel.%
Glob. α 2	13,o	rel.%
Glob. β	15,o	rel.%
Glob. γ	9,o	rel.%

Sonstige Laborwerte: 18. 2. 69

SGPT	9,9	mU/ml
SGOT	22,o	mU/ml
Alk. Phosph.	285.o	mU/ml

Histologie: Februar 1967

Frühbehandlung: Bestrahlung Axilla und Hals links

Jetzige Behandlung: Steroide

Versuchsnummer: 16 — Lymphogranulomatose
Tag d. Versuchs 16. 2. 70 — seit: 3 Jahren, IV
weiblich, 28 Jahre

Im September fieberhafte Bronchitis, Haematome an den Beinen, geringe Atemnot, sonst Wohlbefinden

Lymphknoten: nicht vergrößert

Milztumor: Milz leicht anstoßen

Blutstatus: 16. 2. 70
Leuko. 6 600
Ery. 3.80 Mill.,
Hgb. 12.5 g%
HBE 32 %
Thromb. 94 000
BSG 12/97

Elektrophorese: 27. 10. 69

Ges.-Eiweiß:		5.25	g%
Albumine		59.5	rel.%
Glob. α	1	5.0	rel.%
Glob. α	2	7.5	rel.%
Glob. β		10.5	rel.%
Glob. γ		17.5	rel.%

Frühbehandlung:

Endoxan, Ultracorten, Natulan, Ultralan
Cyclocapron

Jetzige Behandlung:

Velbe

Versuchsnummer: 17 Lymphogranulomatose
Tag d. Versuchs/ 7. 7. 69 Seit: 1.5 Jahren II
männlich, 24 Jahre

Anfang 1968 nicht druckschmerzhafte Schwellung am rechten Hals

Lymphknoten: Hals, Inguinalgegend, Paraortal

Blutstatus:				
5. 7. 69	Leuko. 9 800		Ery.	4.6 Mill.
	Segmk.	56 %	Hgb	13.o g%
	Lympho.	26 %	Thromb.	157 000
	Monoz.	2 %	BSG	5/13
	Stabk.	12 %		

Elektrophorese:			
	Ges.-Eiweiß:	5.34 g%	
	Albumine	59.o	rel.%
	Glob. α 1	6.o	rel.%
	Glob. α 2	1o.0	rel.%
	Glob. β	1o.o	rel.%
	Glob. γ	15.o	rel.%

Sonstige Laborwerte:

6. 7. 69			
	SGOT	7.8	mU:ml
	Alk. Phosph.	164	mU/ml
	Saur.Phosph.	12.8	mU:ml

Frühbehandlung:

Natulan, Lymphknotenexstirpation

Jetzige Behandlung:

Natulan, Vincristin, Endoxan, Gamma-Globulin

Versuchsnummer: 18 — Lymphogranulomatose
Tag d. Versuchs: 18. 8. 69 — seit: 2 Jahren, IV
männlich, 47 Jahre

Seit zwei Jahren an Größe kontinuierlich zunehmende derbe, indolente Schwellungen in beiden Supraklavikulargruben. Guter Allgemeinzustand.

Lymphknoten: Supraclaviculär, inguinal, paraaortal, iliacal, hilär

Blutstatus: 13. 8. 69

Leuko.	9 900	Ery.	4.3o Mill
Segmk.	68 %	Hgb	12.3 g%
Lymph.	14 %	HBE	3o.7
Monoz.	11 %	Thromb.	259 000
Jug.	1 %	BSG	11o/125
Stabk.	5 %		

Elektrophorese:

Ges.-Eiweiß:	8.45	g%
Albumine	35.o	rel.%
Glob. α 1	6.o	rel.%
Glob. α 2	1o.o	rel.%
Glob. β	15.o	rel.%
Glob. γ	34.o	rel.%

Sonstige Laborwerte: 13. 8. 69

SGOT	18.7 mU/ml	Alk. Phos.	311 mU/ml
SGPT	22.o mU/ml	Saur.Phos.	18.2 mU/ml
LDH	125 mU/ml		

Frühbehandlung:

Diabolen-Compositum

Jetzige Behandlung:

keine

Versuchsnummer: 19 — Lymphogranulomatose
Tag d. Versuchs: 29.10.69 — seit: 2 Jahren, II
weiblich, 34 Jahre

Guter Allgemeinzustand, Wohlbefinden, Verdacht auf CA der linken Brust

Lymphknoten: infra- und supraklavikulär

Blutstatus:

Leuko.	4 500	Ery.	3.6 Mill
Segmk.	62 %	Hgb.	10.7 g%
Lymph.	9 %	HBE	30
Monoz.	7 %	Thromb.	229 000
Eosin.	1 %	BSG	88/121
Stabk.	1 %		

Elektrophorese:
10. 10. 69

Ges.-Eiweiß:	6.15	g%
Albumine	48.0	rel.%
Glob. α 1	7.0	rel.%
Glob. α 2	15.0	rel.%
Glob. β	16.0	rel.%
Glob. γ	14.0	rel.%

Sonstige Leberwerte:
10. 10. 69 — Alk. Phosph. 23 mU/ml

Frühbehandlung:

Velbe, Endoxan, Ultracortan, Bestrahlung

Jetzige Behandlung:

Velbe, Paraxin 500

Versuchsnummer: 20 — Lymphogranulomatose
Tag d. Versuchs: 2. 2. 70 — seit: 5 Monaten, III
männlich, 25 Jahre

Januar erkrankt mit Husten, Auswurf, Schmerzen im Hals, Gewichtsabnahme, jetzt Wohlbefinden

Lymphknoten: Mediastinal

Blutstatus: 2. 2. 70				
Leuko.	4 500	Ery.	4.3o Mill
Segmk.	72 %	Hgb.	14.o g%
Lymph.	15 %	HBE	33 %
Eosin.	1 %	Thrombo	190 000
		BSG	28/56

Elektrophorese: 12. 1. 70			
Ges.-Eiweiß:	5.95 g%		
Albumine	55.o	rel.%	
Glob. $\alpha 1$	5.o	rel.%	
Glob. $\alpha 2$	1o.o	rel.%	
Glob. β	1o.o	rel.%	
Glob. γ	2o.o	rel.%	

Sonstige Laborwerte:
12. 1. 70
CRP. negativ

Frühbehandlung:

Velbe, Bestrahlung

Jetzige Behaddlung:

Velbe

Versuchsnummer: 21 — Lymphogranulomatose
Tag d. Versuchs: 26. 3. 69 — seit: 11 Monaten, IV
männlich, 22 Jahre

Kachektischer Allgemeinzustand, pleurale Ergußbildung rechts

Lymphknoten: Erhebliche Drüsenpakete supramandibulär supraklavikulär und axillar, mediastinal und abdominal

Blutstatus: 26. 3. 69				
Leuko.	2 000	Ery.	4,5	Mill.
Segmk.	23 %	Hgb.	13,5	g%
Lympho.	2 %	Hämatokr.	43	%
Monoz.	2 %	Retik.	4,5	‰
Eos.	59 %	Thromb.	116 000	
Baso.	3 %	BSG	50/90	

Elektrophorese:			
Ges.-Eiweiß:		5.21	g%
Albumine		4o,o	rel.%
Glob.	$\alpha 1$	11,o	rel.%
Glob.	$\alpha 2$	10,o	rel.%
Glob.	β	20,o	rel.%
Glob.	γ	10,o	rel.%

Sonstige Laborwerte:

18. 3. 69		
SGOT	16.6	mU/ml
SGPT	7.o	mU/ml
LDH	155	mU/ml
Alk.Phosph.	170	mU/ml

Frühbehandlung:

Velbe, Bestrahlung (Tele-Kobalt)
Endoxan, Steroide, Vinicristin

Jetzige Behandlung:

Endoxan

4. Lymphosarkomatose

Versuchsnummer: 22 Lymphosarkomatose
Tag d. Versuchs: 13. 3. 69
männlich

Über diesen Versuch können keine weiteren Angaben gemacht werden, da das Krankenblatt nicht aufzufinden war.

B. Tabellarische Darstellung der Versuchsergebnisse

1. Erläuterung der tabellarischen Darstellung der Ergebnisse

Unsere tabellarischen Ergebnisse, deren Darstellungsweise im folgenden auch durch ein Beispiel erläutert wird, führen in der linken oberen Ecke die Nummer des Versuches, unter der Angaben über das Geschlecht der Versuchsperson zu finden sind. In der rechten oberen Ecke ist aufgeführt, ob es sich um einen Kontrollversuch mit Lymphozyten von gesunden Personen handelt, oder ob der Patient an chronisch lymphatischer Leukämie oder an Lymphogranulomatose erkrankt war. In diesem Fall ist unter der Erkrankungsart auch die Erkrankungsdauer, im Fall der Lymphogranulomatose auch das Stadium der Erkrankung angegeben.

Tabellenbeispiel für eine an Lymphogranulomatose erkrankte Patientin.

Versuchsnummer: 3 Lymphogranulomatose
weiblich seit: 2 Jahren, IV

	3	5	7	9	11	Tage
BLASTen	60	70	45	20	-	%
TRANSitional cells	-	6	-	-	-	%
MITOsen	-	2	-	-	-	%
MAKROphagen	-	-	32	40	-	%
LYMPHOzyten	36	22	23	40	-	%

Die in Großbuchstaben geschriebenen Teile der Zellnamen erscheinen in den späteren Tabellen aus Abkürzungen.

Waren eine oder mehrere Zellformen bei der Auswertung nicht zu entdecken, so ist dieses in den Tabellen durch einen Querstrich angegeben, wie es in unserem Beispiel nach drei-, fünf-, sieben- und neuntägiger Kultivierung der Fall ist. War ein Objektträger vollkommen leer, so ist das, wie in unserem Beispiel nach elftägiger Kultivierung, ebenfalls durch Querstriche dargestellt. In einigen wenigen unserer Versuche erstreckte sich die Kultivierung nur über 9 Tage, da entweder ein Versuchstier starb, oder die zur Verfügung stehenden Zellsuspensionen nicht ausreichten. Der fehlende elfte Kulturtag ist in diesem Fall durch Fortlassen der Zeitangabe in der Spalte unserer Kultivierungstage zum Ausdruck gebracht.

2. Tabellen

Versuchsnummer: 1 Kontrollversuch
männlich

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	80	75	65	50	40	%
TRANS:	1o	8	1o	5	5	%
MITOS:	1	2	-	-	-	%
MAKRO:	-	-	-	2	5	%
LYMPH:	9	15	25	43	50	%

Versuchsnummer: 2 Kontrollversuch
männlich

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	88	81	69	40	38	%
TRANS:	8	1o	12	5	3	%
MITOS:	1	1	-	-	-	%
MAKRO:	-	-	-	2	3	%
LYMPHO:	3	8	19	53	56	%

Versuchsnummer: 3 Kontrollversuch
weiblich

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	83	77	63	51	41	%
TRANS:	9	14	7	5	4	%
MITOS:	1	1	-	-	-	%
MAKRO:	-	-	-	2	2	%
LYMPH:	7	8	30	42	53	%

Versuchsnummer: 4 Kontrollversuch

männlich

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	76	68	57	46	30	%
TRANS:	1o	11	6	4	-	%
MITOS:	2	-	-	-	-	%
MAKRO:	-	-	-	5	55	%
LYMPHO:	12	21	37	45	55	%

Versuchsnummer: 5 Kontrollversuch

männlich

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	90	76	66	49	37	%
TRANS:	5	7	8	-	-	%
MITOS:	-	--	-	-	-	%
MAKRO:	3	-	-	5	1o	%
LYMPH:	2	17	26	46	53	%

Versuchsnummer: 6 Kontrollversuch

weiblich

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	68	76	65	47	38	%
TRANS:	14	13	1o	3	-	%
MITOS:	2	1	1	-	-	%
MAKOR:	-	-	-	5	15	%
LYMPH:	16	1o	24	45	47	%

Versuchsnummer: 7 Kontrollversuch

weiblich

	3	5	7	9	Tage
BLAST:	83	78	75	73	%
TRANS:	7	13	9	6	%
MITOS:	2	-	1	-	%
MAKRØ:	-	-	1	2	%
LYMPH:	8	9	14	19	%

Versuchsnummer: 8 Kontrollversuch

männlich

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	77	50	30	13	11	%
TRANS:	2	19	14	18	7	%
MITOS:	3	1	1	-	-	%
MAKRO:	-	-	2	20	11	%
LYMPH:	19	30	53	49	71	%

Versuchsnummer: 9 — Chronisch lymphatische Leukämie
männlich — seit: 15 Jahren

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	13	9	5	6	-	%
TRANS:	1	3	6	9	-	%
MITOS:	1	-	-	-	-	%
MAKRO:	-	-	-	-	-	%
LYMPHO:	85	88	89	85	100	%

Versuchsnummer: 10 — Chronisch lymphatische Leukämie
weiblich — seit: 7 Jahren

	3	5	7	9	Tage
BLAST:	32	33	38	21	%
TRANS:	1	4	10	6	%
MITOS:	1	1	-	-	%
MAKRO:	-	-	-	-	%
LYMPH:	66	62	52	73	%

Versuchsnummer: 11 — Chronisch lymphatische Leukämie
männlich — seit: 9 Jahren

	3	5	7	9	Tage
BLAST:	19	37	8	7	%
TRANS:	2	9	18	18	%
MITOS:	2	1	-	-	%
LYMPH:	77	53	74	73	%
MAKRO:	-	-	-	-	%

Versuchsnummer: 12 — Chronisch lymphatische Leukämie
männlich — seit: 1 Monat

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	8,5	14	46	18,5	-	%
TRANS:	1	5	17,5	1o	-	%
MITOS:	-	-	-	-	-	%
MAKRO:	-	-	-	-	-	%
LYMPHO:	90,5	81	31,5	71,5	-	%

Versuchsnummer: 13 — Chronisch lymphatische Leukämie
männlich — seit: 4 Jahren

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	3,5	1	1o	-	-	%
TRANS:	1	-	2	5	-	%
MITOS:	-	-	-	-	-	%
MAKRO:	-	-	-	-	-	%
LYMPH:	95,5	99	88	95	1oo	%

Versuchsnummer: 14 — Chronisch lymphatische Leukämie
weiblich — seit: 3 Jahren, 3 Monaten

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	9	23	-	-	-	%
TRANS:	-	1	-	-	-	%
MITOS:	-	-	-	-	-	%
MAKRO:	-	-	-	7o	75	%
LYMPH:	91	76	1oo	3o	25	%

Versuchsnummer: 15 — Lymphogranulomatose
weiblich — seit: 3 Jahren, IV

	3	5	7	9	Tage
BLAST:	24	1o	15	15	%
TRANS:	2	9	8	6	%
MITOS:	1	-	1	2	%
MAKRO:	13	16	22	67	%
LYMPH:	60	65	54	1o	%

Versuchsnummer 16 — Lymphogranulomatose
weiblich — seit: 3 Jahren, IV

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	9	1o	13	1o	-	%
TRANS:	6	1o	9	8	1	%
MITOS:	2	1	-	-	-	%
MAKRO:	-	2	9	2o	37	%
LYMPHO:	83	77	69	62	62	%

Versuchsnummer: 17 — Lymphogranulomatose:
männlich — seit: 1.5 Jahren II

	3	5	7	9	Tage
BLAST:	78	75	73	7o	%
TRANS:	2	3	6	5	%
MITOS:	1	-	2	-	%
MAKRO:	-	1	7	15	%
LYMPH:	19	21	12	1o	%

Versuchsnummer: 18 — Lymphogranulomatose
männlich — seit: 2 Jahren, II

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	55	33	35	18	10	%
TRANS:	8	6	9	10	6	%
MITOS:	2	-	1	1	-	%
MAKRO:	-	-	-	-	20	%
LYMPH:	35	62	55	71	64	%

Versuchsnummer: 19 — Lymphogranulomatose
weiblich — seit: 2 Jahren, II

	3	5	7	9	11	Ta ge
BLAST:	60	70	45	20	-	%
TRANS:	4	6	-	4	-	%
MI TOS:	-	2	-	2	-	%
MAKRO:	-	-	32	40	-	%
LYMPH:	36	22	25	34	-	%

Versuchsnummer: 20 — Lymphogranulomatose:
männlich — seit: 5 Monaten, III

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	29	67,5	24	29	-	%
TRANS:	8	14	9,5	21	-	%
MITOS:	0,5	1,5	1,5	-	-	%
MAKRO:	2,5	2	0,5	0,5	35	%
LY MPH:	60	15	65	49,5	65	%

Versuchsnummer: 21 — Lymphogranulomatose
männlich — seit: 11 Monaten, IV

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	3	6	5	2	-	%
TRANS:	3	5	2	1	-	%
MITOS:	2	-	1	-	-	%
MAKRO:	14	19	23	41	48	%
LYMPH:	78	70	69	56	52	%

Versuchsnummer: 22 — Lymphosarkomatose
männlich — seit: ?

	3	5	7	9	11	Tage
BLAST:	49	28	12	31	7	%
TRANS:	1	3	-	2	-	%
MITOS:	2	1	-	-	-	%
MAKRO:	3	-	-	-	-	%
LYMPH:	45	68	87	67	93	%

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

ALGIRE, G.H., J.M. WEAVER u. R.T. PREHN:
Growth of cells in Vivo in diffusion chambers.
I. Survival of homografts in immunized mice.
J. Nat. Cancer Inst. 15, 493 - 507, 1954

ALGIRE, G.H.: Diffusions-Chamber techniques for
studies of cellular immunity. Ann. N.Y. Acad.
69, 663 - 667, 1957

ALGIRE, G.H., J.M. WEAVER u. R.T. PREHN: Studies
on tissue homotransplantation in mice, using
diffusion-chamber methods. Ann. N.Y. Acad.
64, 1009 - 1013, 1957

ALGIRE, G.H., M.L. BORDERS u. V.J. EVANS: Studies
of heterografts in diffusions chambers in mice.
J. Nat. Cancer Inst. 20, 1187 - 1201, 1958

ALGIRE, G.H.: Growth inhibition of homografts of a
plasma-cell neoplasma in cell-impenetrable
diffusion chambers placed in hyperimmunized mice.
J. Nat. Cancer Inst. 23, 435 - 439, 1959

AMOS, D.B. und J.D. WAKEFIELD: Growth of mouse
ascites tumor cells in diffusion chambers.
I. Studies of growth rate of cells and of rate
of entry of antibody. J. Nat. Cancer Inst.
21, 657 - 670, 1958

ASKONAS, B.A. und J. M. RHODES: Immunogenicity of
antigen-containing ribonucleid acid preparations
form makrophages. Nature (Lond.) 205, 470 - 474, 1965

ASTALDI, G. u. L. C. GIRAUDO: Blastic transformation in in phytohaemagglutinin cell culture of lymphozytes from lymphocytic leukaemias und lymphomas. Arch. Biol. (Liège) 69, 653 - 672, 1968

ASTALDI, G. u. R. AIRO: The response of different lymphocytes to phytohaemagglutinin. J. Reticuloendothelial Soc. 6, 34 - 49, 1969

AURICH, G. U. W. PLENERT: Über die Abhängigkeit der Lymphozytentransformation von unterschiedlichen Kulturbedingungen und vom Alter. Folia haemat. (Leipzig) 92, 131 - 143, 1969

BACH, F. u. H. HIRSCHHORN: Gammaglobuline production by human lymphocytes in vitro. Exp. Cell Res. 32, 592 - 595, 1963

BERMAN, L. u. H. S. KAPLAN: The cultivation of mouse bone marrow in vivo. Blood, 14, 1040 - 1046, 1959

BERMAN, L. u. C. S. STULBERG: Primary cultures of macrophages from normal human peripheral Blood. Lab. Invest. 11, 1322, 1962

BOURONCLE, B. A., K. P. CLAUSEN u. J. F. ASCHENBRAND: Studies of delayed response of phytohaemagglutinin (PHA) stimulated lymphocytes in 25 chronic lymphatic leukemia patients befor und during therapy. Blood, 34, 166 - 178, 1969

BRENT, L.: Tissue transplantation immunity Prog. Allergy 5, 271 - 348, 1958

BRODY, J. I. u. L. H. BEIZER: Immunologic incompetence of the neoplastic lymphocyte in chronic lymphocytic leukemia. Ann. Intern. Med. 64, 1237 - 1245, 1966

COOPER, E. H.: Measuring lymphocyte transformation. Lancet I, 51 - 52, 1966

COULSON, A. S. und CHALMERS, D. G.: Effects of phytohaemagglutinin on leukocytes, Lancet II, 819 - 820, 1964

DAMESHEK, W.: Immunocytes and immunproliverative disorders. In: The thymus, experimental and clinical studies. pp. 399 - 415, - Ciba Foundation Symposium, Ed. by G.E.W. Wolstenholme and R. Porter, J. u. A. Churchill, London 1966

DAMESHEK, W.: Chronic lymphocytic leukemia an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. Blood 29, 566 - 584, 1967

DORSET, M. u. R. R. HENLEY: Production of clear and sterilized antihog-cholera serum. J. agric. Res. 6, vi, 333 - 338, 1916

DOUGLAS, S. D. , R. M. KAMIN und H.H. FUDENBEG: Human lymphocyte response to phytomitogens in vitro: Normal, agammaglobulinemic and paraproteinemic individuals, J. Immun. 1o3, 1185 - 1196, 1969

DUKOR, P. u. F. M. DIETRICH: Impairment of phytonaemmagglutinin-induced plastic transformation in lymphnodes from thymectomized mice. Int. Arch. Allergy 32, 521 - 544, 1967

ELVES, M. W., S. ROATH u. M.G.G. ISRAELIS: The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro. Lancet I, 806 - 807, 1963 a

ELVES, M.W., S. ROATH, G. TAYLOR u. M.G.G. ISRAELIS: The in vitro production of antibody by lymphocytes Lancet I, 1292 - 1293, 1963 B.

ELVES, M.W.: "The in vitro transformation of lymphocytes". In: Current Research in Leukaemia, pp. 164 - 176, Cambridge University Press 1965.

ELVES, M.W.: The lymphocytes, pp. 1 - 294, Lloyd-Luke, London 1966

FARNER, P., B.E. BARKER, L.E. BROWNHILL u. H. FANGER: Mitogenic activity in Phytolacca americana (Pokeweed). Lancet 2, 1100 - 1101, 1964

FISHMAN, M.: Antibody formation in vitro, J. exp. Med. 114, 837, - 856, 1961

FISHMAN, M. u. F.L. ADLER: Antibody formation initiated in vitro. II. antibody synthesis in x - irradiated recipients of diffusion chambers containing nucleic and derived from makrophages incubated with antigen. J. exp. Med. 117, 595 - 602, 1963

FRIEDMAN, H.P., A.B. STAVITSKY u. J.M. SOLOMON: Induction in vitro of antibodies to phage T 2: antigens in the RNA extract employed. Science 149, 1106 - 1107, 1965

FUCHS, E. u. G. GORIN: Diffusions of protein molecules through membranes of controlled pore size. Biochem. a. Biophy. Res. Comm. 5, 196 - 202, 1961

FUDENBERG, H.H., R.A. GODO, W. HITZIG et al. Classification of the primary immune deficiencies: Who recommendation. N. Engl. J. Med. 283, 656 - 657, 1970

GOLDHABER, P.: Preliminary observations on bone isografts within diffusion chambers. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 98, 53 - 56, 1958

GODO, R.A., W.D. KELLY, J. RÖTSTEIN u. R.L. VARCO: Immunological deficiency disease. Progr. Allergy 6, 187 - 319, 1962

GORER, P.A.: Some recent work on tumor immunity. Advances Cancer Res. 4, 149 - 186, 1956

GOUGH, J., M. W. ELVES u. M.C.G. ISRAELIS: The formation of makrophages form lymphocytes in vitro. Exp. Cell Res. 38, 476 - 482, 1965

GRASBECK, R., C. NORDMAN u. A. de la CHAPELLE: Mitogenic action of antileucocyte immune serum on peripheral leukocytes in vitro. Lancet II, 385 - 396, 1963

GROPP. A. u. R. FISCHER: Ergebnisse der Züchtung von Lymphozyten in vitro. Klin. Wschr. 44, 665 - 671, 1966

GROPP, A. u. F. KLEE: Ergebnisse der Lymphozytenkultur in vitro bei Lymphadenosen. Verh. Deutsch. Ges. Path. 53, 503 - 508, 1969

HAVEMANN, K- u. A.D. RUBIN: The delayed response of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to phytohemagglutinin in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 668 - 671, 1968 a

HAVEMANN, K. u. MI SCHMIDT: Lymphozytenkulturen bei Hodgkinscher Erkrankung: Hinweise für zwei Lymphozytenpopulationen mit unterschiedlicher Reaktion auf Phytohämagglutinin (PHA) Klin. Wschr. 46, 31 - 33, 1968 b

HEINE, K.M., H. STOBBE u. H. WEBER: Lymphozytentransformationstest bei chronisch lymphatischer Leukose unter Berücksichtigung der absoluten Lymphozytenzahl im Blut. Acta haemat. (Basel) 41, 144 - 153, 1969

HERSH, E.M. u. J.E. HARRIS: Macrophage-Lymphocyte interaction in the antigen-induced blastogenic response of human peripheral blood leukocytes. J. Immun. 100, 1184 - 1194 1968

HIRSCHHORN, K., R. R. SCHREIBMANN, F.H. BACH u. L. E. SILTZBACH:
In vitro studies of lymphocytes from patients with sarcoidosis and lymphoproliferative diseases. Lancet II. 842 - 843, 1964 a

HIRSCHHORN, K., R.R. SCHREIBMANN, S. VERBO u. R.H. GRUSKIN:
Action of Streptolysin S on peripheral lymphocytes of normal subjects and patients with acute rheumatic fever. Proc. nat. Acad. Sci (Wash.) 52, 1151 - 1157, 1964 b

HITZIG, W. H.: Lymphozyten und Proteine. Acta haemat. 36, 50 - 62, 1966

HOLUB, M.: Potentialities of the small lymphocyte as revealed by homotransplantation and autotransplantation experiments in diffusion chambers.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 99, 477 . 486, 1962

HULLIGER, L.: Über die unterschiedliche Entwicklungsfähigkeit des Blutes und der Lymphe in vitro. Virchows. Arch. path. Anat. 329, 289 - 318, 1956

HUMPHREY, J.H. u. R.G. WHITE: Immunology for students of medicine, Oxford: Blackwell 1970

HUMPHREY, J.H. u. R.G. WHITE: Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Stuttgart: Thieme 1971

JACKSON, S.M., J.V. GARRETT u. A.W. CRAIG: Lymphocyte transformation changes during the clinical course of hodgkin's disease. Cancer 25, 843 - 850, 1970

KORNFELD, S.: Decreased phytohemagglutinin receptor sites in chronic lymphotic leukemia.
Biochim. Biophys. Acta 192, 542 - 545, 1969

KORNFELD, S., R. KORNFELD: Solubilization and partial characterization of a phytohaemagglutinin receptor site form human erythrocytes.
Proc. Nat. acad. Sci. USA 63, 1439 - 1446, 1969

LENNERT, K.: Bildung und Differenzierung der Blutzellen, insbesondere der Lymphozyten. Verh. dtsch. ges. path. 50, 163 - 213, 1966.

LEUTHART: Lehrbuch der physiol. Chemie Springer, 1968.

LING, N.R. u. E.M. HUSBAND: Specific and nonspecific stimulation of peripheral lymphocytes.
Lancet I, 363 - 365, 1964

MAXIMOW, A. Der Lymphozyt als gemeins. Stammzelle der verach. Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfet. Leben der Säugetiere.
Folia haemat. 8, 125 - 134, 1909

Mc FARLAND, W. u. D.H. HEILMANN: Lymphocyte foot appendage: its role in lymphocyte function and in immunological reactions.
Nature (Lond.) 205, 887 - 888, 1965

METCALF, D.: The effect of thymectomy on the lymphoid tissues of the mouse.
Brit. J. Haemat. 6, 324 -333, 1960

METCALF, D.: The nature and regulation of lymphopoiesis in the normal and neoplastic thymus. In Thymus, Experimental and clinical studies Ed. by G. E. W. Wolstenholme und R. Porter Churchill, London 1966

MICHALOWSKI, A.J., J. JASINSKA, W.J. BRZOSKO u. A. NOWOSLAWSKI: Cellular localisation of the mitogenic principle of phytohaemagglutinin in leucocyte cultures.
Exp. Cell. Res 34, 417 - 419, 1964

MILLER, D.G., J.G. LIZARDO u. R.K. SYNDERMAN:
Homologous and heterologous skin transplantation in patients with lymphomatous disease.
J. Nat. Canc. Inst. 26, 569 - 584, 1961

MILLER, J.F. A.P.: Ciba Foundation Symp. Transplantation p. 384, Churchill, Lond. 1962

MILLER, J.F., D. OSOBA u. P. DUKOR:
A humoral thymus mechanism responsible for immunologic maturation
Ann. N.Y. Acad. Sci. 124, 95 - 104, 1965

NAJARAN, J.S., J.D. FELDMAN:
Passive transfer of transplantation immunity
I. Tritiated lympoid cells
II. Lymphoid cells in millipore chambers
J. exp. Med. 115, 1083 - 1093, 1962

NOSSAL, G.J.: Studies on the rate of seeding of lymphocytes from the intact guinea pig thymus.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 120, 171 - 181, 1964

NOSSAL, G.J. u. G.L. ADA: antigens, lymphoid cells and the immune response. Academic press
New York and London 1971

NOWELL, P.C.: Phytohemagglutinin: An initior of mitosis in cultures of normal human leukocytes.
Cander Res. 20, 462 - 466, 1960

OPPENHEIM, J.J., J. WHANG u. E. FREI:
Immunologic and cytogenetic studies of chronic lymphocytic leukemic cells.
Blood 26, 121 - 132, 1965

ORFANOS, C., A. PAPPAS u. P. G. SCHEURLEN:
Blutlymphozyten im Licht- und Elektronenmikroskop nach Stimulation mit Phytohämagglutinin
I. Wirkung von Phytohämagglutinin auf die Lymphozyten Gesunder. Z. ges. exp. Med. 149, 283 - 293, 1969

OSGOOD, E. E. u. M. L. KRIPPAEHNE: The gradient tissue culture method. Exp. Cell Res. 9, 116 - 127, 1955

PAPPAS, A. u. P. G. SCHEURLEN: Untersuchungen über den Einfluß von Plasma Hodgkin-Kranker auf die Phytohämagglutinin-Transformation normaler Lymphozyten. Verh. Deutsch. Ges. Inn. Med. 74, 1254 - 1256, 1968

PAPPAS, A., C. ORFANOS u. P. G. SCHEURLEN:
Blutlymphozyten im Licht- und Elektronenmikroskop nach Stimulation mit Phytohämagglutinin.
II. Transformation der Lymphozyten durch Phytohämagglutinin bei Lymphogranulomatose und chronischer Lymphadenose. Z. ges. exp. Med. 149, 294 - 305, 1969

PAPPAS, A., K. J. LENNARTZ, P. G. SCHEURLEN u. H. FREYBERGER:
Proliferationskinetik phytohämagglutinin-stimulierter Lymphozyten von Patienten mit chronischer Lymphadenose und Lymphogranulomatose. Med. Welt 4, 123 - 127, 1971

PARKER, jr., F., H. JACKSON jr., J. M. BETHEA u. F. OTIS:
Studies of diseases of lymphoid and myeloid tissues; coexistence of tuberculosis with Hodgkin's disease and other forms of malignant lymphoma
Amer. J. med. Sci. 184, 694 - 699, 1932

PARRISH, W. u. R. G. KLEINFELD: Maturation of transplantable leukemic cells cultivated in vivo in diffusion chambers. Cancer Res. 23, 1164 - 1169, 1963

PEARMAIN, G. R., R. R. LYCETTE u. P. H. FITZGERALD: Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet I, 637,- 638, 1963

PREHN, R. T., J. M. WEAVER u. G. H. ALGIRE: The Diffusion-Chamber technique apllied to a study of the nature of homograft resistance. J. Nat. Cancer Inst. 15, 509 - 517, 1954

QUAGLINO, D. u. D. C. COWLING: Cytochemical studies on cells from chronic lymphocytic leukemia and lymphosarcoma cultured with phytohaemagglutinin. Brit. J. Haemat. 10, 358 - 364, 1964

RABINOWITZ, Y. u. R. SCHREK: Studies of cell source of macrophages from human blood in slide chambers. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 110, 429 - 431, 1962

RABINOWITZ, Y.: Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations. Blood, 23, 811 - 828, 1964

RIGAS, D. A. u. E. E. OSGOOD: Purification and properties of the phytohaemagglutinin of Phaseolus vulgaris. J. Biol. Chem. 212, 607 - 615, 1955

RUBIN, A. D., L. J. JOHNSON u. W. DAMESHEK: The demonstration of a delayed proliferative response in phytohaemagglutinin stimulated lymphocytes from patients with lymphoproliferative disorders. An. Soc. Hemat. Xth Ann. Meet, Blood, 30, 886 - 887, 1967

RUBIN, A. D., K. HAVEMANN u. W. DAMESHEK: Studies in chronic lymphocytic leukemia: further studies of the proliferative abnormality of the blood lymphocyte. Blood, 33, 313 - 328, 1969

SCHEURLEN, P. G.: Immunologische Störungen bei der Lymphogranulomatose: Dtsch. med. Wschr. 92, 1433 - 1435, 1967

SCHEURLEN, P. G., A. PAPPAS u. T. LUDWIG: Stimulation der Blutlymphozyten durch Phytohämagglutinin bei chronischer Lymphadenose, Lymphosarkomatose und Lymphogranulomatose. Klin. Wschr. 46, 483 - 490, 1968

SCHIER, W. W.: Cutaneous anergy and hodgkin's disease. New Engl. J. Med. 250, 353 - 361, 1954

SCHOENBERG, M. D., MUMAW, V. R. u. R. D. MOORE et al: Cytoplasmic interaction between macrophages and lymphocytic cells in antibody synthesis Science 143, 964 - 965, 1964

SCHOOLEY, J. C. u. I. BERMAN: Morphologic and autoradiographic observations of H^3-Thymidine-labeled thoracic duct lymphocytes cultured in vivo. Blood, 16, 1133 - 1144, 1960

SCHREK, R.: Effect of phytohemagglutinin on lymphocytes from Patients with chronic lymphocytic leukemia. Arch. Path. 83, 58 - 63, 1967

SCHWARZE, G.: Meth. u. Klin. experiment. Untersuchungen über die DNS Synthese in Lymphocyten nach Stimulation durch Phytohämagglutinin Inaugural-Dissertation, Köln 1969

SHARP, J. A. u. R. G. BURWELL: Interaction ('peripolesis') of macrophages and lymphocytes after skin homografting or challenge with soluble antigens Nature (Lond.) 188, 474 - 475, 1960

SIEGENTHALER, W.: Klinische Pathophysiologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1970

STEFFEN, C.: Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1969

STONE, H. B. Calcification of diffusion chamber membranes. Med. Med. 30, 34, 1962

THIELE, H. G.: Untersuchungen zur Frage der Immunglobulin-Synthese durch mit Phytohämagglutinin in vitro stimulierte menschliche Lymphocyten . Z. f. Immun. Forsch. 135, 331 - 348, 1968

TRUBOWITZ, S., B. MASEK u. A. Del ROSARIO: Lymphocytes response to PHA in Hodgkin s disease, lymphatic leukemia and lymphosarkom. N. J. Cancer Res. (Philad.) 19, 2019 - 2023, 1966

VOLK, H., D. MAUERSBERGER, K. ROTHER et al.: Prolonged survival of skin homografts in rabbits defective in the third component of complement Ann. N. Y. Acad. Sci. 120, 26 - 27, 1964

WAKEFIELD, J. D., B. AMOS: The effect of isoantibody on ascites cells grown in diffusion chambers. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2, 354, 1958

WAKSMAN, B.: Tissue damage in the delayed type of hypersensitivity. In: Mech. cell and tissue damage by immune reactions. hrg. von P. Grabar u. P. Miescher, Schwabe, Basel 1962

WEAVER, J. M., G. H. ALGIRE u. R. T. PREHN: The growth of cells in Vivo Diffusions Chambers, II. The role of cells in the destruction of homografts in mice. J. Nat. Cancer Inst. 15, 1737 - 1767, 1955

WILSON, J. D. u. A.E.R.THOMSON: Death and division of lymphocytes
Lancet II, 1120 - 1123, 1968

WOLF, R. O. u. E. G. RENNELS: A study of pituitary grafts in diffusions chambers.
Texas Rep. Biol. Med. 20, 703 - 717, 1962

WOODRUFF, M. F., N. A. ANDERSON: The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of antilymphocytic serum on the survival of skin homografts in rats.
Nature (London) 200, 702 - 705, 1963

Für die Überlassung des Themas und für die Anregung und Hilfe bei der Durchführung der Arbeit danke ich herzlich Herrn Prof. Dr. med. A. Pappas.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. R. Gross und Herrn Prof. Dr. med. J. Zach für die Überlassung des Krankengutes.

Lebenslauf

Am 24. Dezember 1943 wurde ich in Pfaffenhofen/Ilm geboren. Bis zum Jahre 1950 lebte ich mit meiner Mutter in Scheyern, das in der Nähe Pfaffenhofens liegt. Im Frühjahr des Jahres 1950 verlegten wir dann unseren Wohnsitz nach Geldern, wo ich ab Ostern dieses Jahres die Volksschule besuchte. Ostern 1954 trat ich dann auf das dortige Gymnasium über. Hier legte ich im Jahre 1965 meine Reifeprüfung ab. Zum Sommersemester des gleichen Jahres schrieb ich mich an der medizinischen Fakultät der Universität Köln ein. Hier bestand ich im Frühjahr 1966 die naturwissenschaftliche und im Frühjahr 1968 die ärztliche Vorprüfung. Im Sommer des Jahres 1971 legte ich an der medizinischen Fakultät der Universität Köln die ärztliche Prüfung ab. Anfang 1972 begann ich die einjährige Medizinalassistentenzeit, am 5. März 1973 erhielt ich die Approbation als Arzt. Zur Zeit bin ich im Kreiskrankenhaus Bielefeld tätig.

Bielefeld, den 10.5.1973

Helmut Spitaler